



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 968 898**

⑮ Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/82 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.06.2019 E 19382470 (3)**

⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.10.2023 EP 3748362**

⑭ Título: **Método in vitro para detectar enfermedad renal**

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.05.2024

⑬ Titular/es:

FUNDACIÓN INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ (50.0%)
Avenida de los Reyes Católicos, 2
28040 Madrid, ES y
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID (50.0%)

⑭ Inventor/es:

ORTIZ ARDUAN, ALBERTO;
GONZÁLEZ-PARRA, EMILIO;
MORGADO PASCUAL, JOSÉ LUIS;
EGIDO DE LOS RÍOS, JESÚS;
RUIZ-ORTEGA, MARTA y
RAYEGO-MATEOS, SANDRA

⑮ Agente/Representante:

BERTRÁN VALLS, Silvia

ES 2 968 898 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método *in vitro* para detectar enfermedad renal

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo médico. En particular, la presente invención se refiere al uso *in vitro* de los niveles de proteína TRAF3, determinados en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de muestras de sangre obtenidas de donantes sanos y de pacientes, para detectar enfermedad renal, para predecir la respuesta de pacientes que padecen enfermedad renal a un tratamiento con análogos o derivados de la vitamina D, o para decidir o recomendar si se debe tratar a pacientes que padecen enfermedad renal con análogos o derivados de la vitamina D.

10 **Estado de la técnica**

15 La enfermedad renal crónica (ERC) es un tipo de enfermedad renal en la que hay una pérdida gradual de la función renal a lo largo de un período de meses o años. En una etapa temprana, normalmente no hay síntomas. Sin embargo, en una etapa posterior, puede desarrollarse hinchazón de las piernas, sensación de cansancio, vómitos, pérdida de apetito o confusión. Las complicaciones pueden incluir cardiopatía, hipertensión arterial, enfermedad ósea o anemia.

20 Las causas de la ERC incluyen diabetes, hipertensión, glomerulonefritis y enfermedad renal poliquística. Los factores de riesgo incluyen antecedentes familiares de la afección. El diagnóstico generalmente se realiza mediante análisis de sangre para medir la tasa de filtración glomerular y análisis de orina para medir la albúmina. Se pueden realizar pruebas adicionales, como una ecografía o una biopsia de riñón, para determinar la causa subyacente.

25 Se recomienda realizar pruebas de detección a las personas en riesgo. Los tratamientos iniciales pueden incluir medicamentos para controlar la presión arterial, los niveles de azúcar en sangre y reducir el colesterol. Se deben evitar los AINE. Otras medidas recomendadas incluyen mantenerse activo y ciertos cambios en la dieta. La enfermedad grave puede requerir terapias de reemplazo como hemodiálisis, diálisis peritoneal o un trasplante de riñón. También pueden ser necesarios tratamientos para la anemia y enfermedad ósea.

30 La ERC afectó a 753 millones de personas en todo el mundo en 2016, incluidos 417 millones de mujeres y 336 millones de hombres. En 2015 provocó 1,2 millones de muertes, frente a 409.000 en 1990. Las causas que contribuyen al mayor número de muertes son la hipertensión arterial con 550.000, seguida de la diabetes con 418.000 y la glomerulonefritis con 238.000.

35 El diagnóstico de ERC se basa en gran medida en los antecedentes, la exploración y la tira reactiva de orina: filtración glomerular y/o albuminuria normalizada con respecto a los niveles o la concentración de creatinina urinaria. 40 Es importante diferenciar la ERC de la lesión renal aguda (LRA) porque la LRA puede ser reversible. Una pista de diagnóstico que ayuda a diferenciar la ERC de la LRA es un aumento gradual de la creatinina sérica (a lo largo de varios meses o años) en lugar de un aumento repentino de la creatinina sérica (varios días o semanas). En muchos pacientes con ERC, ya se conocen una enfermedad renal previa u otras enfermedades subyacentes. Un número importante de pacientes presentan ERC de causa desconocida. Los pacientes pueden progresar de la ERC a daño renal terminal (ERT).

45 Además de controlar otros factores de riesgo, el objetivo de la terapia es ralentizar o detener la progresión de la ERC. El control de la presión arterial y el tratamiento de la enfermedad original son los principios generales del tratamiento.

50 Hoy en día, la definición de biomarcadores fiables de la progresión de la enfermedad renal y el tratamiento eficaz de la misma es una necesidad clínica insatisfecha.

55 Se ha identificado la referencia [TRAF3 delays cyst formation induced by NF-KB signaling. Sun L, Hu C, Zhang X. IUBMB Life. Marzo de 2017;69(3):170-178. doi: 10.1002/iub.1601. Epub de 10 de febrero de 2017], pero el enfoque divulgado en la misma difiere claramente de la presente invención. Sun L., *et al.* 2017 solo proporcionan experimentos *in vitro* en una línea celular transformada en la que la proteína TRAF3 se sobreexpresa para determinar su asociación con la proliferación celular y la apoptosis, ambas características de la poliquistosis renal. Tenga en cuenta que la enfermedad renal, particularmente la ERC, analizada en la presente invención puede considerarse como una indicación médica diferente en comparación con la poliquistosis renal. Cabe señalar que la ERC se caracteriza por inflamación y fibrosis, mientras que no se ha informado de apoptosis en la ERC humana. De hecho, la poliquistosis renal es una enfermedad renal hereditaria muy específica que tiene una etiología genética autosómica dominante. Esto ocurre debido a mutaciones en los genes PKD1 o PKD2, que codifican para las proteínas policistina-1 y policistina-2 (PC-1 y PC-2). Por otro lado, tenga en cuenta que Sun L., *et al.* 2017 no proporcionan conclusiones confiables y reproducibles. Es importante considerar que en Sun L., *et al.* 2017 no se han utilizado controles habituales como reactivos de transfección aislados o vectores vacíos, por lo que los resultados

proporcionados en esta publicación con respecto a la sobreexpresión de TRAF3 podrían no ser concluyentes. También es importante señalar que, si bien en la presente invención los niveles de proteína TRAF3 se miden en pacientes con ERC, los niveles renales de TRAF3 en riñones lesionados no se determinan en Sun L., *et al.* 2017. Por último, pero no menos importante, tenga en cuenta que en la presente invención se utilizan muestras mínimamente invasivas porque los niveles de TRAF3 se determinan en células sanguíneas obtenidas de pacientes con ERC. En consecuencia, el método descrito en la presente invención es un procedimiento no invasivo, que permite monitorear a los pacientes midiendo los niveles de TRAF3 a lo largo del tiempo. Sin embargo, Sun L., *et al.* 2017 guarda completo silencio sobre la posibilidad de utilizar muestras de sangre.

10 Así, la presente invención se centra en proporcionar una solución a una clara necesidad médica no cubierta, que es el hallazgo de biomarcadores fiables de la progresión de la enfermedad renal y el tratamiento eficaz de la misma. La presente invención resuelve este problema utilizando niveles de proteína TRAF3, determinados en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de muestras de sangre obtenidas del paciente, para detectar enfermedad renal, para predecir la respuesta de pacientes que padecen enfermedad renal a un tratamiento con análogos o derivados de la vitamina D, o para decidir o recomendar si se debe tratar a pacientes que padecen enfermedad renal con análogos o derivados de la vitamina D.

15

Descripción de la invención

20 Breve descripción de la invención

La presente invención muestra claramente (ver ejemplos 1 y 2) que los niveles de proteína TRAF3 se reducen significativamente en pacientes que padecen enfermedad renal en diferentes escenarios: 1) en células mononucleares de sangre periférica (PMBC) de pacientes con ERT frente a sujetos sanos, 2) en tejido renal procedente de modelos animales en los que se indujo daño renal mediante la administración de TWEAK, ácido fólico (AF) u obstrucción ureteral unilateral (UUO) (3 modelos diferentes y aceptados de ERC experimental) y 3) estudios *in vitro* desarrollados en células epiteliales tubulares (células renales representativas de origen humano [HK2] o murino [MCT]) y células mononucleares de sangre periférica (PMBC) en las que se indujo daño renal mediante la administración de TWEAK. Además, la presente invención también demuestra que el uso de análogos o derivados de la vitamina D, por ejemplo, paricalcitol, da lugar a un aumento de los niveles de proteína TRAF3 lo que provoca una respuesta terapéutica positiva en el daño renal inducido por TWEAK u otro tipo de modelos de lesión renal aguda (LRA) o enfermedad renal crónica (ERC). En este caso, se observó una reducción de la expresión de marcadores proinflamatorios asociados con el daño renal, incluida una nueva modulación terapéutica de la ruta de señalización NF- κ B2.

35 Particularmente, la primera realización descrita en el presente documento se refiere a un método *in vitro* para determinar el nivel de proteína TRAF3 en un paciente que comprende: a) aislar células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de muestras de sangre obtenidas del paciente, y b) determinar el nivel de TRAF3 mediante el uso de reactivos capaces de detectar TRAF3.

40 La segunda realización de la presente invención se refiere a un método *in vitro* para detectar enfermedad renal que comprende: a) determinar al menos el nivel de proteína TRAF3 siguiendo el método de la primera realización, y b) en el que si el nivel determinado en el paso (a) es estadísticamente inferior al nivel determinado en sujetos de control sanos, esto es una indicación de que el paciente padece enfermedad renal.

45 La tercera realización de la presente invención se refiere a un método *in vitro* para predecir la respuesta de pacientes que padecen enfermedad renal a un tratamiento con análogos o derivados de la vitamina D que comprende: a) determinar al menos el nivel de proteína TRAF3 siguiendo la primera realización después de la administración del análogo o derivado de la vitamina D, y b) en el que si el nivel determinado en el paso (a) es estadísticamente superior al nivel de expresión determinado antes de la administración del análogo o derivado de la vitamina D, esto es una indicación de que el paciente responde al tratamiento.

50

55 La cuarta realización de la presente invención se refiere a un método *in vitro* para decidir o recomendar si se debe tratar a pacientes que padecen enfermedad renal con análogos o derivados de la vitamina D que comprende: a) determinar al menos el nivel de proteína TRAF3 siguiendo la primera realización, y b) en el que si el nivel determinado en el paso (a) es estadísticamente inferior al nivel determinado en sujetos de control sanos, se recomienda un tratamiento con análogos o derivados de la vitamina D.

60 La sexta realización de la presente invención se refiere al uso *in vitro* del nivel de proteína TRAF3 determinado en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de muestras de sangre obtenidas del paciente para detectar enfermedad renal, para predecir la respuesta de pacientes que padecen enfermedad renal a un tratamiento con análogos o derivados de la vitamina D, o para decidir o recomendar si se debe tratar a pacientes que padecen enfermedad renal con análogos o derivados de la vitamina D.

65 La séptima realización que no forma parte de la presente invención se refiere a un kit adecuado para medir el nivel de TRAF3 en un paciente que comprende: a) herramientas para aislar células mononucleares de sangre periférica

(PBMC) a partir de muestras de sangre obtenidas del paciente; y b) reactivos capaces de detectar TRAF3.

La octava realización que no forma parte de la presente invención se refiere al uso del kit definido anteriormente para detectar enfermedad renal, para predecir la respuesta de pacientes que padecen enfermedad renal a un tratamiento con análogos o derivados de la vitamina D, o para decidir o recomendar si se debe tratar a los pacientes que padecen enfermedad renal con análogos o derivados de la vitamina D.

En una realización preferida, la enfermedad renal se manifiesta clínicamente como lesión renal aguda (LRA) o enfermedad renal crónica (ERC), o la enfermedad renal ha progresado a una enfermedad renal terminal (ERT). Para la interpretación de los términos citados anteriormente LRA, ERC y ERT, consulte la siguiente publicación científica: [The Spanish Society of Nephrology (SENEFRO) commentary to the Spain GBD 2016 report: Keeping chronic kidney disease out of sight of health authorities will only magnify the problem. Ortiz A, Sanchez-Niño MD, Crespo-Barrio M, De-Sequera-Ortiz P, Fernández-Giráldez E, García-Maset R, Macía-Heras M, Pérez-Fontán M, Rodríguez-Portillo M, Salgueira-Lazo M, Sánchez-Álvarez E, Santamaría-Olmo R, Simal-Blanco F, Pino-Pino MD. Nefrología. Enero-febrero de 2019;39(1):29-34.doi: 10.1016/j.nefro.2018.09.002. Epub de 28 de noviembre de 2018].

Para los fines de la presente invención, se definen los siguientes términos:

- El término "que comprende" significa que incluye, pero no se limita a, todo lo que sigue a la palabra "que comprende". Por tanto, el uso del término "que comprende" indica que los elementos enumerados son requeridos u obligatorios, pero que otros elementos son opcionales y pueden estar presentes o no.
- Por "que consiste en" se entiende que incluye, y se limita a, lo que sigue a la expresión "que consiste en". Por tanto, la expresión "que consiste en" indica que los elementos enumerados son requeridos u obligatorios y que no puede haber otros elementos presentes.
- Un valor de "referencia" puede ser un valor umbral o un valor límite. Normalmente, un "valor umbral" o "valor límite" se puede determinar de forma experimental, empírica o teórica. También se puede seleccionar arbitrariamente un valor umbral basándose en las condiciones experimentales y/o clínicas existentes, como reconocería un experto habitual en la técnica. El valor umbral debe determinarse para obtener la sensibilidad y especificidad óptimas según la función de la prueba y el equilibrio beneficio/riesgo (consecuencias clínicas de falsos positivos y falsos negativos). Preferiblemente, el experto en la técnica puede comparar los niveles de TRAF3 obtenidos según el método de la invención con un valor umbral definido. Además, para establecer estos valores umbral se puede utilizar la medición retrospectiva de los niveles (o puntuaciones) de TRAF3 en muestras históricas de sujetos debidamente almacenadas. El término "nivel de control de referencia", según la presente invención, puede hacer referencia a dos situaciones diferentes:

- "Nivel de TRAF3 determinado en pacientes que padece enfermedad renal": En este sentido, el paciente se habría tratado con éxito con análogos o derivados de la vitamina D si el nivel de TRAF3 después de la administración del tratamiento es estadísticamente superior en comparación con el nivel determinado en pacientes de control que padecen enfermedad renal.
- "Nivel de TRAF3 determinado en sujetos de control sanos": En este sentido, los pacientes serían identificados como pacientes que padecen enfermedad renal, y en consecuencia seleccionados para recibir un tratamiento con un análogo o derivado de la vitamina D, si su nivel de TRAF3 es estadísticamente inferior en comparación con el nivel determinado en sujetos de control sanos.
- Por "dosis o cantidad terapéuticamente eficaz" de una composición que comprende análogos o derivados de la vitamina D se entiende una cantidad que, cuando se administra como se describe en el presente documento, produce una respuesta terapéutica positiva en un sujeto que tiene enfermedad renal. La cantidad exacta requerida variará de un sujeto a otro, dependiendo de la especie, edad y estado general del sujeto, la gravedad de la afección que se está tratando, el modo de administración y similares. Un experto habitual en la técnica puede determinar una cantidad "eficaz" apropiada en cualquier caso individual utilizando experimentación de rutina, basándose en la información proporcionada en el presente documento.

55 Breve descripción de las figuras

Figura 1. El paricalcitol restauró TRAF3 en varios modelos de daño renal. Evaluación de los niveles de TRAF3 en daño renal experimental, evaluado mediante inmunotransferencia de tipo Western. A. Los ratones se trataron con 750 ng/kg/día de paricalcitol comenzando 48 horas antes de la administración de 0,5 µg de TWEAK y se sacrificaron 24 horas después. B. Los ratones se trataron con 25 ug/kg/día de paricalcitol, comenzando 24 horas antes de 300 mg/kg de ácido fólico (AF) o vehículo (bicarbonato de sodio 0,3 mol/l), y se estudiaron después de 24 horas. C. Los ratones se trataron con 750 ng/kg/día de paricalcitol, comenzando 48 horas antes de la obstrucción ureteral unilateral (UUO) y se estudiaron después de 5 días. D. Paricalcitol restableció los niveles de TRAF3 en células estimuladas por citoquinas. Se pretrataron células tubulares humanas (HK2) (D) o PBMC de donantes sanos (E) con paricalcitol (15 umol/l) 48 horas antes de la estimulación con TWEAK (100 ng/ml) durante 24 horas. Niveles de

proteína TRAF3 mediante inmunotransferencia de tipo Western. Datos expresados como media ± EEM de 6-8 animales por grupo o de 3 experimentos *in vitro*. *p<0,05 frente al control; #p<0,05 frente a células de ERT o células de riñón lesionado o tratadas con TWEAK.

- 5 Figura 2. La sobreexpresión de TRAF3 imita las acciones del paricalcitol. La sobreexpresión de TRAF3 se logró en células cultivadas utilizando un plásmido de ADN activador TRAF3/CRISPR/Cas9. Las células HK2 se estimularon con TWEAK soluble humano recombinante 100 ng/ml. En algunos experimentos, las células se preincubaron durante 48 horas con paricalcitol 15 μ mol/l antes de la estimulación con TWEAK. A. Los niveles de ARNm de TRAF3 aumentan en células transfectadas con el plásmido de activación de TRAF3 CRISPR/Cas9 según lo evaluado mediante PCR en tiempo real. B. La activación de la ruta de NF- κ B2 se evaluó mediante inmunotransferencia de tipo Western de la subunidad p52 de NF κ B2 y la citocina CCL21A regulada por NF κ B2. C y D. La expresión génica en MCT de los factores proinflamatorios CCL2, CCL5 e IL-6 (C) o CCL21A y CCL19 (D) se evaluó mediante PCR en tiempo real. Datos expresados como media ± EEM de 3-5 experimentos independientes. *p<0,05 frente al control; #p<0,05 frente a células tratadas con TWEAK.
- 10 15 Figura 3. El paricalcitol restableció los niveles de TRAF3 en pacientes con ERT y en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) cultivadas. A. Los niveles de proteína TRAF3 en PBMC de pacientes con ERT tratados o no con paricalcitol (15 umol/l) se determinaron mediante inmunotransferencia de tipo Western. Número de pacientes 5-8 por grupo. *p<0,05 frente al control; #p<0,05 frente a células de ERT. B. Los niveles de ARNm de TRAF3 en PBMC de pacientes con ERT tratados o no con paricalcitol se determinaron mediante RT-PCR en tiempo real. Número de pacientes 5-8 por grupo. *p<0,05 frente al control. Número de pacientes 5 por grupo. *p<0,05 frente al control.
- 20 25 Figura 4. La modulación de la ubiquitinación de TRAF3 y la formación de complejos CIAP1 estuvo involucrada en la restauración de los niveles de TRAF3 con paricalcitol. A. En las PBMC de ERT en hemodiálisis, tratadas o no con el activador del receptor de vitamina D (VDRA) paricalcitol, TRAF3 se inmunoprecipitó (IP) mediante un anticuerpo anti-TRAF3 seguido de SDS-PAGE y se realizó una inmunotransferencia de tipo Western (IB) contra anticuerpos anti-ubiquitina-Lys-48, TRAF3 y CIAP1 para analizar el posible vínculo entre ellos. Experimento representativo. Se utilizó anticuerpo contra TRAF3 como control de carga. Número de pacientes 5-8 por grupo. B. Se previno la ubiquitinación de TRAF3 inducida por TWEAK con paricalcitol en células HK2 estimuladas con TWEAK (100 ng/ml) y tratadas o no con paricalcitol (15 umol/l). TRAF3 se inmunoprecipitó (IP) mediante un anticuerpo anti-TRAF3 seguido de SDS-PAGE y se realizó una inmunotransferencia de tipo Western (IB) contra anticuerpos anti-ubiquitina-Lys-48, TRAF3 y CIAP1 para analizar el posible vínculo entre ellos. Experimento representativo. Se utilizó anticuerpo contra TRAF3 como control de carga. Las figuras muestran un experimento de PI representativo de los 3 realizados.
- 30 35 Figura 5. El paricalcitol (VDRA) inhibe la ruta de señalización de NF- κ B no canónica (NF- κ B2), pero no la ruta de señalización de NF- κ B canónica (NF- κ B1) en PBMC de pacientes con enfermedad renal terminal (ERT) en hemodiálisis. La activación de las rutas de NF- κ B canónicas y no canónicas en PBMC se evaluó mediante las actividades de unión al ADN de p65 (A) o p52 y RelB (B), respectivamente. Número de pacientes: 5-8 por grupo. *p<0,05 frente al control sano; #p<0,05 frente a pacientes con ERT sin paricalcitol. (C) Paricalcitol disminuyó los genes proinflamatorios en PBMC de pacientes con enfermedad renal terminal (ERT) en hemodiálisis. Se aislaron PBMC de individuos de control o pacientes con ERT con y sin paricalcitol y se analizaron para determinar la expresión de genes proinflamatorios. La expresión génica se evaluó mediante PCR en tiempo real. Número de pacientes: 5-8 por grupo.
- 40 45 Figura 6. El paricalcitol disminuyó la activación de NF- κ B2 no canónica pero no la activación de NF- κ B canónica inducida por TWEAK en células epiteliales tubulares renales y en PBMC de donantes sanos. A-D. Las células tubulares humanas se trataron previamente con paricalcitol 12 μ M durante 48 horas antes de la estimulación con 100 ng/ml de TWEAK durante 15 minutos (ruta de NF- κ B1) o 6 horas (ruta de NF- κ B2). La activación de NF- κ B1 canónica se evaluó mediante la fosforilación de I κ B α o p65 en extractos de proteínas totales y los niveles de p65 en fracciones citosólicas o nucleares (A y B). La activación de la ruta de NF- κ B2 no canónica se evaluó mediante la evaluación de los niveles de NIK e IKK- α fosforilada en extractos de proteínas totales (A y C) y la ubicación subcelular de las subunidades p100/p52 y Rel B (A y D). Se utilizaron GAPDH e Histona H1 como controles de carga de proteína total y nuclear, respectivamente. A. Inmunotransferencia de tipo Western representativa. B, C y D. Cuantificación de los niveles de proteína expresados como media ± EEM de 4 experimentos. *p<0,05 frente al control. # p<0,05 frente a TWEAK. E. Se pretrataron células PBMC humanas con paricalcitol 12 μ M durante 24 horas, antes de la estimulación con 100 ng/ml de TWEAK (E). La activación de NF- κ B1 canónica se evaluó como p65 fosforilada en fracciones citosólicas y la activación de NF- κ B2 no canónica se evaluó mediante niveles de p52. *p<0,05 frente al control; #p<0,05 frente a estimulado con TWEAK.
- 50 55 Figura 7. El paricalcitol disminuyó los genes proinflamatorios, las PBMC estimuladas por citoquinas de individuos de control o células tubulares en cultivo. A. Se aislaron PBMC de individuos de control con y sin paricalcitol y se analizaron para determinar la expresión de genes proinflamatorios. B. Se aislaron PBMC de individuos de control y se estimularon en cultivo con citocinas. C. Células epiteliales tubulares murinas. Se estimularon PBMC o células epiteliales tubulares murinas cultivadas con 100 ng/ml de TWEAK durante 6 horas. Las células se preincubaron durante 48 horas con 15 μ mol/l de paricalcitol o 60 ng/ml de SN52. La expresión génica se evaluó
- 60 65

mediante PCR en tiempo real. Número. Datos expresados como media \pm EEM de 3-6 experimentos. *p<0,05 frente al control; #p<0,05 frente a células tratadas con TWEAK.

Figura 8. El paricalcitol o el bloqueo de NF- κ B2 mejoraron la inflamación renal inducida por TWEAK. Se trataron ratones C57BL/6 con 750 ng/kg/día de paricalcitol o 0,7 mg/día del inhibidor de NF- κ B2 SN52 (dos dosis; día -1; día 0) comenzando 48 horas antes de 0,5 μ g de TWEAK, y se sacrificaron 24 horas después de la administración de TWEAK. A. La inmunohistoquímica utilizando anticuerpos anti-F4/80 y anti-CD3 identificó monocitos/macrófagos y linfocitos T, respectivamente. Animal representativo de cada grupo. Aumento 200X. B. Cuantificación de la tinción C. El ARN se obtuvo de extractos renales totales y los niveles de expresión de genes proinflamatorios (CCL2, CCL5 e IL6) se determinaron mediante PCR en tiempo real. D. Los niveles de proteína renal CCL2 y CCL5 se evaluaron mediante ELISA. E. Los niveles de expresión de los genes de las citocinas CCL21A y CCL19 reguladas por NF- κ B2 se determinaron mediante PCR en tiempo real. Datos expresados como media \pm EEM de 8-10 animales por grupo. *p<0,05 frente al control. # p<0,05 frente a TWEAK.

Figura 9. El paricalcitol solo inhibe la activación de NF- κ B no canónica inducida por TWEAK *in vivo*. Los ratones se trataron con 750 ng/kg/día de paricalcitol comenzando 48 horas antes de 0,5 μ g de TWEAK y se sacrificaron 24 horas después de la administración de TWEAK. A y B. En ratones inyectados con TWEAK, se encontraron niveles elevados de I κ B α fosforilado citosólico (A) y niveles de p65 nuclear (B), pero no fueron modulados por el tratamiento con paricalcitol, lo que sugiere que el paricalcitol no moduló la activación de NF- κ B1. Se utilizaron GAPDH y rojo de Ponceau como controles de carga. Datos expresados como media \pm EEM de 8-10 ratones por grupo. *p<0,05 frente al control. C. Ubicación nuclear de p52 y Rel B en túbulos renales de ratones inyectados con TWEAK evaluada mediante inmunohistoquímica. D. Evaluación mediante inmunotransferencia de tipo Western de la activación de NF- κ B2 (niveles de p52) en extractos de proteínas de riñón completo. E. En extractos de proteínas nucleares renales, se midió la actividad de unión al ADN de p52 y RelB de NF- κ B2 mediante ELISA. Todos los datos expresados como media \pm EEM de 8-10 animales por grupo. *p<0,05 frente al control. # p<0,05 frente a TWEAK.

Figura 10. El paricalcitol inhibe la regulación por incremento inducida por TWEAK de dianas específicas de NF- κ B2 en el riñón. Los ratones se trataron con 750 ng/kg/día de paricalcitol o 0,7 mg/día del inhibidor de NF- κ B2 SN52 (dos dosis; día -1; día 0) comenzando 48 horas antes de 0,5 μ g de TWEAK, y se sacrificaron 24 horas después de la administración de TWEAK. A. El ARN se obtuvo a partir de extractos renales totales y la expresión génica de las citoquinas CCL21A y CCL19 reguladas por NF- κ B2 se determinó mediante PCR en tiempo real. B. Los niveles de proteína CCL21A se evaluaron mediante inmunotransferencia de tipo Western en proteínas renales totales. Se utilizó GAPDH como control de carga. C. Expresión de CCL21A en el riñón. Ratón representativo de cada grupo. D. La cuantificación del área teñida con CCL21A frente al área total. Datos expresados como media \pm EEM de 8-10 ratones por grupo. *p<0,05 frente al control. # p<0,05 frente a TWEAK.

Figura 11. El péptido SN52 bloquea la activación de NF- κ B2 y la translocación nuclear de p52 en un modelo de daño renal inducido por TWEAK. Los ratones se trataron previamente con 0,7 mg/día de inhibidor de NF- κ B2 SN52 (dos dosis; día -1; día 0) comenzando 48 horas antes de la administración de 0,5 μ g de TWEAK, y se sacrificaron 24 horas después de la administración de TWEAK. A. Inmunohistoquímica de p52 en cortes renales incrustados en parafina. Animal representativo de cada grupo (aumento 200x). B y C. Inmunotransferencia de tipo Western para la fosforilación de p52 (B) y I κ B α (C). Datos expresados como media \pm EEM de 8-10 animales por grupo. *p<0,05 frente al control. # p<0,05 frente a TWEAK.

Figura 12. El paricalcitol inhibe la activación de NF- κ B2, pero no la de NF- κ B1 en la obstrucción ureteral unilateral (UUO) experimental en ratones. Los ratones se trataron con 750 ng/kg/día de paricalcitol, comenzando 24 horas antes de la UUO, y se estudiaron 5 días después de la UUO. A. Inmunohistoquímica en cortes renales incrustados en parafina. Animal representativo de cada grupo (aumento 200x). B. Inmunotransferencia de tipo Western, la activación de NF- κ B2 se evaluó como niveles de p52 en extractos de proteínas totales. C. En proteínas nucleares renales aisladas, se midieron mediante ELISA las actividades de unión al ADN de p52 y RelB. D y E. Se utilizó la evaluación por inmunotransferencia de tipo Western de los niveles nucleares de la fosforilación de p65 (D) y de I κ B α citosólico (E) para evaluar la activación de la ruta de NF- κ B1. En cada ratón, se compararon los riñones obstruidos (Ob) con el correspondiente riñón contralateral no obstruido (Nob). Datos expresados como media \pm EEM de 6-8 animales por grupo. *p<0,05 frente al contralateral #p<0,05 frente al riñones obstruidos.

Figura 13. El paricalcitol disminuye la inflamación renal en obstrucción ureteral unilateral (UUO) experimental en ratones. Los ratones se trataron con 750 ng/kg/día de paricalcitol, comenzando 24 horas antes de la UUO, y se estudiaron 5 días después de la UUO. En cortes renales incrustados en parafina, la inmunohistoquímica utilizando anticuerpos anti-F4/80 y anti-CD3 identificó monocitos/macrófagos y linfocitos T, respectivamente. A. Animal representativo de cada grupo. Aumento 200X. B, C. En el ARN obtenido a partir de extractos renales totales, la expresión de genes proinflamatorios (CCL2, CCL5, IL-6, TNF- α e IL-17A) y la expresión de genes específicos regulados por NF κ B2 (CCL19 y CCL21) se determinaron mediante PCR en tiempo real. Datos expresados como media \pm EEM de 6-8 animales por grupo. *p<0,05 frente al riñón contralateral no obstruido (NOB); #p<0,05 frente a riñones obstruidos (Ob).

Figura 14. El paricalcitol inhibe la activación de NF- κ B2, pero no la de NF- κ B1 en la lesión renal inducida por ácido

5 fólico. Los ratones se trataron con 25 µg/kg/día de paricalcitol comenzando 24 horas antes de la administración de 300 mg/kg de ácido fólico (AF) o vehículo (bicarbonato de sodio 0,3 mol/l), y se estudiaron 24 horas después de la inyección de AF. A. La inmunohistoquímica reveló la localización nuclear de p52 y RelB que disminuyó con paricalcitol. Animal representativo de cada grupo (aumento 200x). B y C. Inmunotransferencia de tipo Western de p52, como evidencia de activación de NF-κB2 (B) y fosforilación de IκBα como evidencia de activación de NF-κB1 (C). D. Niveles de proteína CCL2 evaluados por ELISA. E. En proteínas nucleares renales aisladas, la actividad de unión al ADN de RelB se evaluó mediante ELISA. F. Niveles de proteína CCL21 evaluados en extractos de proteínas renales totales mediante inmunotransferencia de tipo Western. G. El ARN se obtuvo de extractos renales totales y los niveles de expresión de genes proinflamatorios se determinaron mediante PCR en tiempo real. H. Se muestran datos de los niveles séricos de BUN. Datos expresados como media ± EEM de 6-8 animales por grupo. *p<0,05 frente al control; #p<0,05 frente al riñones de ácido fólico.

10

15 Figura 15. El paricalcitol disminuye la inflamación renal inducida por el ácido fólico en ratones. Los ratones se trataron con 25 µg/kg/día de paricalcitol, comenzando 24 horas antes de 300 mg/kg de ácido fólico o vehículo (bicarbonato de sodio 0,3 mol/L), y se estudiaron 24 horas después de la administración de ácido fólico. Inmunohistoquímica en cortes renales incrustados en parafina utilizando anticuerpos anti-F4/80 y anti-CD3 que identifican monocitos/macrófagos y linfocitos T, respectivamente. La figura muestra un animal representativo de cada grupo. Aumento 200X.

20 Figura 16. El paricalcitol inhibe la regulación por incremento inducida por TWEAK de dianas específicas de NF-κB2 en células con el gen MARSS silenciado (otro posible receptor de vitamina D). El silenciamiento del gen MARSS se logró en células cultivadas utilizando un ARNip prediseñado y validado contra MARSS. Las células se estimularon con 100 ng/ml de TWEAK soluble humano recombinante. En algunos experimentos, las células se preincubaron durante 48 horas con 15 µmol/l de paricalcitol antes de la estimulación con TWEAK. A. La activación de la ruta de 25 NF-κB2 se evaluó mediante inmunotransferencia de tipo Western de p52 de NFκB2. Datos expresados como media ± EEM de 3-5 experimentos independientes. *p<0,05 frente al control; #p<0,05 frente a células tratadas con TWEAK.

Descripción detallada de la invención

30 Ejemplo 1. Material y métodos.

Ejemplo 1.1 Modelos experimentales.

35 Todos los procedimientos con animales se realizaron de acuerdo con los directrices de investigación con animales en la Comunidad Europea y con la aprobación previa del Comité de Ética de Investigación en Salud del IIS-Fundación Jiménez Díaz. Para los estudios *in vivo*, los ratones recibieron una inyección intraperitoneal diaria de VDRA Paricalcitol comenzando 48 horas antes de la inducción del daño renal.

40 En el momento del sacrificio, los animales se anestesiaron con 5 mg/kg de xilazina (Rompun, Bayer AG) y 35 mg/kg de ketamina (Ketolar, Pfizer) y los riñones se perfundieron *in situ* con solución salina fría antes de extraerlos. Luego, las porciones de riñón se fijaron en tampón de formalina para estudios de inmunohistoquímica o se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido para estudios de genes y proteínas.

45 Administración de TWEAK: ratones hembra C57BL/6 (9-12 semanas, peso de 20 g, 7-8 animales por grupo) recibieron una única inyección intraperitoneal de 0,5 µg de TWEAK disueltos en solución salina y se sacrificaron 24 horas después, como se describió previamente (Sanz *et al.* 2008). A los controles se les inyectó el vehículo salino (n = 8-10 ratones por grupo). El nivel de endotoxina de TWEAK fue <0,1 ng/mg, confirmado por MALDI-TOF. Algunos animales recibieron 750 ng/kg/día de paricalcitol o 0,7 mg/ratón/día de inhibidor de NF-κB2 SN52, comenzando 48 horas antes de la administración de TWEAK. Los animales se sacrificaron 24 horas después. La dosis de paricalcitol 50 se eligió en función de la experiencia previa en afecciones renales inflamatorias leves.

55 La obstrucción ureteral unilateral (UUO) se estableció en ratones macho C57BL/6 bajo anestesia inducida por isoflurano. El uréter izquierdo se ligó con seda (5/0) en dos lugares y se cortó entre ligaduras para prevenir una infección del tracto urinario (riñón obstruido). (Ucero *et al.* 2014; Rodrigues-Díez *et al.* 2013). Se estudiaron dos grupos; no tratados o tratados con paricalcitol (750 ng/kg/día, i.p., Abbot), n=6-8 ratones por grupo, comenzando 48 horas antes de la cirugía. Los estudios compararon ambos riñones (contralateral frente a obstruido) en cada ratón.

60 La nefropatía por ácido fólico es un modelo clásico de lesión e inflamación tubulointersticial renal que se ha informado en humanos. Los ratones recibieron una única inyección intraperitoneal de 300 mg/kg de ácido fólico (Sigma) en 0,3 mol/l de bicarbonato de sodio o vehículo, y se sacrificaron 48 horas después. Se estudiaron dos grupos; no tratados o tratados con paricalcitol (25 µg/kg/día, i.p., Abbot), n=7-8 por grupo comenzando 48 horas antes de la inyección de AF. La dosis de paricalcitol se eligió basándose en experimentos preliminares de búsqueda de dosis.

Ejemplo 1.2. Células cultivadas.

Se cultivaron células epiteliales del túbulo proximal de riñón humano (línea celular HK2, ATCC CRL-2190) en RPMI 1640 con suero bovino fetal (FBS) al 10 %, glutamina al 1 %, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 5 µg/ml de insulina-transferrina-selenita y 36 ng/ml de hidrocortisona en 5 % de CO₂ a 37 °C. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 60 al 70 %, se les agotó el suero durante 24 horas antes del experimento.

5 Las células murinas túbulo-epiteliales proximales (línea celular MCT) se obtuvieron originalmente de Dr. Eric Neilson (Universidad de Vanderbilt) y se utilizaron para estudios de expresión génica. Estas células se cultivaron en RPMI 1640 con FBS al 10 %, glutamina al 1 %, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina en 5 % de CO₂ a 37 °C. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 60 al 70 %, se mantuvieron en RPMI con FBS al 1 % durante 10 24 horas.

15 Las células se estimularon con 100 ng/ml de TWEAK soluble humano recombinante (Millipore) o 200 µg/ml de sulfato de p-cresilo (Raymond Vanholder y Griet Glorieux, Universidad de Gent, Bélgica). Las concentraciones de TWEAK y sulfato de p-cresilo se basaron en experimentos de dosis-respuesta publicados anteriormente (Poveda *et al.* 2014; Sanz *et al.* 2008). En algunos experimentos, las células se preincubarón durante 48 horas con 12 µmol/l de paricalcitol (Abbott) antes de la estimulación. El DMSO, utilizado como disolvente en algunos casos, no tuvo ningún efecto sobre la viabilidad celular ni sobre los niveles de expresión génica.

Ejemplo 1.3. Aislamiento de PBMC.

20 Se midieron los niveles de proteína intracelular y ARNm en PBMC de pacientes con ERT en hemodiálisis. Los criterios de inclusión fueron los siguientes: edad >45 años; sexo masculino; consentimiento informado; y ausencia de enfermedades inflamatorias, infecciosas o malignas activas al inicio o durante el estudio. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética del IIS-Fundación Jiménez Díaz. Los pacientes fueron inscritos después de proporcionar su 25 consentimiento informado por escrito. Las PBMC se separaron de las muestras de sangre completa (30 ml en tubos con EDTA) mediante un método de centrifugación en gradiente de densidad utilizando centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll. En total, se obtuvieron 50x10⁶ PBMC de 30 ml de sangre completa y se usaron 6x10⁶ PBMC para aislar los niveles de proteína, ARN y proteína nuclear/citosólica utilizando el reactivo NE-PER (Pierce) 30 siguiendo las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 1.4. Histología e inmunohistoquímica renales.

35 Se tiñeron cortes renales incrustados en parafina (3 µm) utilizando métodos convencionales. La recuperación del antígeno se realizó mediante el sistema de enlace PTlink (Dako Diagnostics) con tampón citrato de sodio (10 mmol/l) ajustado a pH 6-9 dependiendo del marcador inmunohistoquímico, seguido de tinción inmunohistoquímica en un dispositivo Dako Autostainer. Pasos: 1) bloqueo de peroxidasa endógena; 2) incubación de anticuerpos primarios; anticuerpos anti-CD3 (1:300; Dako) o anti-F4/80 (1:5000; Serotec); p-p65 de NF-κB (1:200; Cell Signalling); p52 de 40 NF-κB2 (1:50; Cell Signalling); RelB (1:50; Santa Cruz Biotechnology); CCL21 (1:90; Santa Cruz Biotechnology); 3) lavado; 4) Tratamiento en DUOFLEX Doublestain EnVision™, utilizando 3,3'-diaminobencidina como cromógeno.

40 Para la tinción F4/80, se utilizó un ligador de conejo anti-IgG de rata antes de EnVision. Los cortes se contratiñeron con hematoxilina de Carazzi.

45 La intensidad de la marca reactiva se obtuvo utilizando el software Image-Pro Plus. Para cada muestra (procesada por duplicado de forma ciega), el valor promedio se obtuvo del análisis de 4 campos (objetivo 20X) como densidad/mm² o porcentaje de área teñida frente a área total analizada. Los datos se expresan como aumento en veces con respecto a los ratones de control, como media ± EEM de 8-10 animales por grupo. Los controles negativos incluyen inmunoglobulina no específica y ningún anticuerpo primario.

Ejemplo 1.5. Estudios de proteínas.

50 Las proteínas se obtuvieron de células tratadas o riñones de ratón usando tampón de lisis (Tris-HCl 50 mmol/l, NaCl 150 mol/l, EDTA 2 mmol/l, EGTA 2 mmol/l, Triton X-100 al 0,2 %, IGEPAL al 0,3 %, cóctel de inhibidores de proteinasa 10 µl/ml, PMSF 0,2 mmol/l y ortovanadato 0,2 mmol/l). Para determinar el contenido de proteína se utilizó el método BCA.

55 Para la inmunotransferencia de tipo Western, se separaron extractos de proteínas de células (25 µg/carril) y de riñón (100-150 µg/carril) en geles de poliacrilamida-SDS al 6 %-12 % en condiciones reductoras. Luego, las muestras se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (BioRad), se bloquearon con TBS/leche desgrasada al 5 %/Tween-20 al 0,05 % y se incubaron durante la noche a 4 °C con los siguientes anticuerpos (dilución): anti-p100/p52 de NF-κB2 (1:500), p-p65 de NF-κB (1:500) y p65 de NF-κB (1:500, Cell Signalling); CCL-21A (sc-25445, 1:500); RelB (sc-226, 1:500); p-IKKa (sc-101706, 1:500); p-IκBα (sc-8404, 1:500), IκBα (sc-371, 1:500); TRAF3 (sc-6933, 1:250); CIAP-1 (sc-271419, 1:500); NIK (sc-7211, 1:500); VDR (sc-1008, 1:250, Santa Cruz Biotechnology). Posteriormente, las membranas se incubaron con anticuerpo secundario IgG conjugado con peroxidasa y se revelaron utilizando un kit de quimioluminiscencia ECL (Amersham). Los controles de carga incluyeron anticuerpos anti-GAPDH (1:10000; Chemicon), anti-α tubulina (1:5000; Sigma-Aldrich) o anti-histona H1 (sc-8030, 1:250, Santa Cruz Biotechnology) para proteínas nucleares o niveles de proteínas totales en estudios de fosforilación. Las autorradiografías se

escanearon utilizando el generador de imágenes Gel Doc™ EZ y se analizaron con el software Image Lab 3.0 (BioRad).

5 Se utilizó ELISA para evaluar los niveles de las quimiocinas CCL2 y CCL5 (eBioscience). En muestras renales, el contenido de proteína total se determinó mediante el método BCA y se analizaron cantidades iguales de proteína. Los datos se expresan como un aumento en n veces con respecto a la media de los niveles de control.

Ejemplo 1.6. Estudios de expresión génica.

10 El ARN total se aisló de células y muestras de riñón de ratón con Trizol (Invitrogen). El ADNc se sintetizó utilizando el kit de archivo de ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems) utilizando 2 µg de ARN total cebado con cebadores hexámeros aleatorios. La PCR múltiple en tiempo real se realizó utilizando ensayos de expresión de Applied Biosystems para muestras murinas y humanas: CCL2 Mm00441242_m1; CCL5 Mm_01302428_m1; IL-6 Mm_00446190_m1; CCL19 Mm_00839967_g1, CCL21A Mm_036466971_gH; TRAF3 Hs_00936781_m1; CCL19 - Hs_00171149_m1; CCL21A Hs_00989654_m1. Los datos se normalizaron a 18S; 4210893E (VIC) y GAPDH Mm99999915_g1. Los números de copias de ARNm se calcularon para cada muestra mediante el software del instrumento utilizando el valor Ct. Los resultados se expresan en números de copias, calculados en relación con células no estimuladas o ratones de control, después de la normalización frente a 18S.

20 Ejemplo 1.7. Ensayo de NF-κB2 y RelB basado en ELISA.

Las fracciones nucleares y citoplasmáticas se separaron de los tejidos renales utilizando el reactivo NE-PER (Pierce) siguiendo las instrucciones del fabricante. En extractos nucleares renales, la actividad de unión al ADN de NF-κB2 y RelB se midió mediante su unión a un oligonucleótido que contiene el sitio consenso de NF-κB utilizando un kit de familias de NF-κB TransAM (Active Motif) con un anticuerpo que solo reconoce p52 y RelB de NF-κB2 activo.

Ejemplo 1.8. Expresión de genes de activación por magnetofección.

30 La sobreexpresión génica se realizó en células cultivadas utilizando el plásmido de ADN de activación TRAF3CRISPR/Cas9 (Santa Cruz Biotechnology). Las células subconfluentes se transfecaron con una mezcla de magnetofection™ (OZ biosciences) [reactivo de magnetofección PolyMag CRISPR (1 µl) + plásmido de ADN (1 µg)] durante 30 minutos sobre la placa magnética según las instrucciones del fabricante. Luego, las células se incubaron con FBS al 10 % inactivado por calor durante 24 horas y se incubaron en medio sin suero durante 24 horas antes de los experimentos. Las células se estimularon con TWEAK soluble humano recombinante (Millipore). En algunos experimentos, las células se preincubaron durante 48 horas con 12 µmol/l de paricalcitol (Abbott) antes de la estimulación. La activación de la ruta de NF-κB2 se evaluó mediante expresión génica y análisis por inmunotransferencia de tipo Western utilizando anticuerpos anti-p100/p52 de NF-κB2 1:200 y CCL21A 1:200. Se utilizó anticuerpo anti-TRAF3 (1:250, Santa Cruz Biotechnology) para evaluar la especificidad y la eficiencia de la sobreexpresión, y se utilizó anticuerpo anti-GAPDH (1:10000) como control de carga.

40 Ejemplo 1.9. Silenciamiento génico.

45 El silenciamiento génico en células cultivadas se realizó utilizando un ARNip prediseñado correspondiente a VDR (Stealth Select RNAi™, Ambion). Las células subconfluentes se transfecaron durante 24 h con 25 nmol/l de ARNip utilizando 50 nmol/l de Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, según las instrucciones del fabricante). Luego, las células se incubaron con FBS al 10 % inactivado por calor durante 24 h, seguido de 24 h en medio sin suero.

Ejemplo 1.10. Ensayos de coimmunoprecipitación.

50 Las células que crecieron en placas de cultivo de tejidos se lisaron en 300-500 µl de tampón de lisis Triton-NP-40 [Tris-HCl 50 mmol/l, pH 8, NaCl 150 mmol/l, fluoruro de feniometilsulfonilo 1 mmol/l, NP-40 al 1 %/IGEPAL y un cóctel de inhibidores de fosfatasa (Juego II, Calbiochem)], se rasparon de la placa y se incubaron durante 1 hora a 4 °C con agitación. Los lisados celulares se aclararon previamente incubando con 10 µl de suspensiones de perlas de agarosa y proteína A (0,5 ml de agarosa/2 ml de solución salina tamponada con fosfato) durante 30 minutos a 4 °C y luego se centrifugaron tres veces durante 5 minutos a 2500 rpm para lavar los sobrenadantes. Los lisados previamente aclarados se incubaron con 2,5-5 µg de anticuerpo monoclonal de ratón anti-TRAF3 (sc-6933, Santa Cruz Biotechnology) durante la noche a 4 °C. Los complejos inmunitarios se capturaron mediante la adición de suspensiones de perlas de proteína A/G PLUS-agarosa (20 µl) durante 1 hora a 4 °C. Las perlas de agarosa se recogieron mediante centrifugación, se lavaron tres veces con tampón de lisis, se resuspendieron en tampón de muestra 2x Laemmli, se hirvieron durante 5 minutos y se sometieron a SDS-PAGE. Luego se realizó una inmunotransferencia de tipo Western como se describió anteriormente, usando anticuerpos anti-ubiquitina-Lys-48 específicos 1:250 (n.º 05-1307, Millipore) o anticuerpos anti-TRAF3 1:250 (sc-6933, Santa Cruz Biotechnology).

Ejemplo 1.11. Análisis estadístico.

65 Todos los resultados se expresan como media ± EEM. Las diferencias entre los grupos de intervención y los

controles se evaluaron mediante la prueba de Mann-Whitney. $P<0,05$ se consideró significativo. El análisis estadístico se realizó mediante el software estadístico SPSS (versión 11.0).

Ejemplo 2. Resultados.

- 5 • TRAF3 como biomarcador fiable de daño renal.
- Ejemplo 2.1. TRAF3 está regulado por disminución en riñones lesionados en diferentes modelos experimentales de daño renal.
- 10 En primer lugar, se evaluaron los cambios en los niveles de proteína TRAF3 en diferentes modelos experimentales de daño renal. En diferentes modelos experimentales de daño renal en ratones, incluida la lesión renal inducida por ácido fólico, la inflamación renal mediada por TWEAK y la obstrucción ureteral unilateral, los niveles de TRAF3 se regularon por disminución en los riñones lesionados, según lo determinado por inmunotransferencia de tipo Western en proteínas renales totales (Figuras 1A; 1B y 1C). A continuación, se evaluó el efecto directo de los mediadores del daño renal en la modulación de TRAF3. Los estudios se realizaron en células epiteliales tubulares humanas cultivadas como células renales representativas que expresan componentes de la ruta de NF- κ B2 no canónica que promueven la lesión renal y en PBMC de donantes sanos. Las células se estimularon con un inductor débil de apoptosis similar al factor de necrosis tumoral (TWEAK), una de las pocas citocinas que puede activar ambas rutas de NF- κ B. La estimulación con TWEAK reguló por disminución los niveles de TRAF3, tanto en células renales como en PBMC (Figuras 1D y 1E).
- Ejemplo 2.2. TRAF3 modula la ruta de NF- κ B2 no canónica y las citocinas proinflamatorias.
- 25 Para investigar las consecuencias funcionales de la modulación de TRAF3, las células se transfectaron con un plásmido de activación de TRAF3 CRISPR/Cas9 (Figura 2A). La sobreexpresión de TRAF3 en células HK2 bloqueó la activación de p52 inducida por TWEAK (Figura 2B), así como el aumento de la expresión de genes proinflamatorios como CCL2, CCL5 e IL6 (Figura 2C), así como genes regulados por NF- κ B2 (Figura 2D).
- 30 Ejemplo 2.3. TRAF3 está regulado por disminución en las células circulantes de pacientes con enfermedad renal crónica.
- 35 A continuación, se investigaron los niveles de TRAF3 en pacientes con ERT utilizando PBMC, el principal tipo de célula implicado en la patogénesis de las enfermedades inflamatorias. En las PBMC de pacientes con ERT, la proteína TRAF3 estaba regulada por disminución en comparación con los controles sanos (Figura 3A), mientras que los niveles de ARNm de TRAF3 estaban regulados por incremento, lo que sugiere que la modulación de los niveles de proteína TRAF3 se produce mediante modificaciones posttraduccionales (Figura 3B).
- 40 En resumen, los datos preclínicos de la presente invención muestran que, en respuesta al daño renal, los niveles de TRAF3 se regulan por disminución en las células renales y PBMC estimuladas por citoquinas, así como en los riñones murinos lesionados. Además, en las células circulantes de pacientes con ERT, los niveles de TRAF3 también se regularon por disminución. Todos estos datos muestran que TRAF3 es un biomarcador fiable de daño renal.
- 45 Ejemplo 2.4. La regulación por disminución de TRAF3 en las células circulantes de pacientes con enfermedad renal crónica está relacionada con la progresión a ERT.
- 50 Por otro lado, se investigaron los niveles de TRAF3 en dos grupos de pacientes con ERC, un grupo de pacientes que no progresan a ERT y otro grupo que progresan. Se utilizaron PBMC de pacientes con ERC que pertenecen a esos grupos. La proteína TRAF3 se reguló por disminución claramente en muestras de pacientes en progreso en comparación con pacientes no en progreso.
- 55 En resumen, los datos preclínicos de la presente invención muestran que los niveles de TRAF3 se regulan por disminución en las células circulantes de pacientes que progresan a ERT, en comparación con pacientes con ERC que no progresan a ERT. Todos estos datos muestran que TRAF3 es un biomarcador fiable de la progresión del daño renal.
- 60 • Los niveles de TRAF3 están modulados por tratamientos terapéuticos con análogos o derivados de la vitamina D.
- Ejemplo 2.5. Evaluación de la modulación de TRAF3 por VDRA en pacientes con ERT.
- 65 En las PBMC de pacientes con ERT tratados con paricalcitol en hemodiálisis, los niveles de proteína TRAF3 se restauraron a valores en el rango de los controles sanos, mientras que no se encontraron cambios en los niveles de ARNm de TRAF3, lo que sugiere que el paricalcitol previene la degradación de TRAF3 (Figuras 3A, 3B).

Ejemplo 2.6. Evaluación de la modulación de TRAF3 por VDRA en células estimuladas por citoquinas y en riñones lesionados.

- 5 En células epiteliales tubulares cultivadas (línea celular HK2), la preincubación con paricalcitol restauró los niveles de proteína TRAF3 inducidos por TWEAK a valores similares a los de las células de control no tratadas (Figura 1D). En consecuencia, en las PBMC de donantes sanos, el paricalcitol inhibió la degradación de TRAF3 inducida por TWEAK (Figura 1E).
- 10 En diferentes modelos experimentales de daño renal en ratones (lesión renal inducida por ácido fólico, inflamación renal mediada por TWEAK y obstrucción ureteral unilateral), el tratamiento diario con paricalcitol, iniciado un día antes del daño renal, restauró los niveles de proteína TRAF3 renal a los valores de los ratones de control. (Figuras 1A; 1B y 1C).
- 15 A continuación, se investigaron los mecanismos ascendentes involucrados en la degradación de TRAF3. En las PBMC de pacientes con ERT, los estudios de inmunoprecipitación de TRAF3 mostraron una mayor ubiquitinación de TRAF3 en las cadenas unidas a K48, lo que lleva a la formación de complejos CIAP1-TRAF3 (Figura 4A). En los pacientes tratados con paricalcitol, la ubiquitinación de TRAF3 y la interacción CIAP1-TRAF3 disminuyeron significativamente a valores en el rango de los controles sanos (Figura 4A). Además, los niveles de CIAP-1 fueron más altos en los extractos de proteínas completas de PBMC de pacientes con ERT que en los controles sanos, 20 mientras que los niveles en pacientes con ERT tratados con paricalcitol estaban cerca de los valores de control (Figura 4A). Se observaron resultados similares en células cultivadas estimuladas por citoquinas. En las células HK2, la estimulación con TWEAK indujo la ubiquitinación de TRAF3 y la formación del complejo CIAP1-TRAF3 y esto se impidió mediante paricalcitol (Figura 4B).
- 25 Ejemplo 2.7. La modulación de TRAF3 por paricalcitol se relacionó con la activación e inflamación de la ruta de NF- κ B2 no canónica.

- El VDRA paricalcitol inhibe la activación de la ruta de NF- κ B2 no canónica sin modular la ruta de NF- κ B1 canónica en PBMC de pacientes con ERC.

- 30 En las PBMC de pacientes con ERT en hemodiálisis, se activaron las rutas de NF- κ B tanto canónicas como no canónicas, como lo demuestra el aumento de las actividades de unión al ADN de p65/NF- κ B1 y RelB o p52/NF- κ B2 (Figuras 5A y 5B). Curiosamente, en las PBMC de pacientes con ERT tratados con paricalcitol, la activación de p65/NF- κ B1 fue similar a la de los pacientes con ERT sin paricalcitol, mientras que la activación de la ruta de NF- κ B2 se inhibió (Figuras 5A y 5B). Estos datos indican que el paricalcitol solo inhibe la activación de NF- κ B2 no canónica.
- 35 • El paricalcitol disminuye las citocinas proinflamatorias inducidas por citocinas en pacientes con ERT.

- 40 En las PBMC de pacientes con ERT en hemodiálisis, los niveles de expresión de genes proinflamatorios aumentaron, pero fueron significativamente más bajos en pacientes con ERT tratados con paricalcitol (Figura 5C). Esta observación respalda las propiedades antiinflamatorias del paricalcitol en la ERC humana.

Ejemplo 2.8. Evaluación de la modulación de TRAF3 por VDRA en células y su posible relación con la regulación de rutas de NF- κ B/inflamatorias.

- 45 • El paricalcitol solo regula la activación de la ruta de NF- κ B2 en células cultivadas estimuladas por citocinas
- 50 En células epiteliales tubulares cultivadas (línea celular HK2), TWEAK aumentó la fosforilación de p65 y la fosforilación de I κ B α y reguló por disminución los niveles de I κ B α citosólico (Figuras 6A y 6B). La preincubación con paricalcitol no moduló la activación de NF- κ B1 inducida por TWEAK (Figuras 6A y 6B), mientras que el paricalcitol inhibió la fosforilación de IKK- α inducida por TWEAK, el aumento de los niveles nucleares de NIK y p52 y RelB (Figuras 6A, 6C y 6D). Por lo tanto, el paricalcitol inhibió la activación inducida por TWEAK de la ruta de NF- κ B no canónica, pero no moduló la activación de NF- κ B canónica.
- 55 En las PBMC de donantes sanos, el paricalcitol inhibió la activación de NF- κ B2 inducida por TWEAK sin modular la ruta de NF- κ B1 canónica (Figura 6E).
- 60 La regulación directa del paricalcitol de los genes proinflamatorios se confirmó en células cultivadas. En las PBMC obtenidas de donantes sanos, el paricalcitol inhibió la regulación por incremento inducida por TWEAK de varios genes proinflamatorios, como CCL2, CCL5 e IL6, así como los genes controlados por NF- κ B2 CCL21A y CCL19 (Figura 7A). Se obtuvieron resultados similares en células tubulares cultivadas (Figura 7B y 7C). Además, en las células tubulares, la inhibición de NF- κ B2 con el péptido SN52 impidió la regulación por incremento de genes proinflamatorios inducida por TWEAK (Figuras 7B y 7C), imitando los efectos del paricalcitol.

Ejemplo 2.9. Evaluación de la modulación de TRAF3 por VDRA en modelos experimentales preclínicos de daño renal y su posible relación con la regulación de rutas de NF-κB/inflamatorias.

- Paricalcitol disminuye la inflamación renal inducida por TWEAK en ratones al modular la activación de la ruta NF-κB2 no canónica.

5 La administración de TWEAK provoca una respuesta inflamatoria aguda en riñones murinos y activa las rutas de NF-κB tanto canónicas como no canónicas. Por lo tanto, se utilizó un modelo de inflamación renal inducida por TWEAK para evaluar el efecto del paricalcitol sobre la activación de NF-κB en el riñón. En ratones inyectados con TWEAK, el paricalcitol disminuyó significativamente la regulación por incremento inducida por TWEAK de monocitos/macrófagos infiltrantes (células F4/80⁺), linfocitos T (células CD3⁺) (Figuras 8A y 8B) y factores proinflamatorios, como CCL2, CCL5 y IL-6 (Figuras 8C y 8D). En riñones de ratones inyectados con TWEAK, la fosforilación de IκB α y los niveles de p65 de NF-κB nuclear fueron más altos que en los controles, pero no se modificaron en respuesta al paricalcitol (Figuras 9A y 9B). Sin embargo, el paricalcitol inhibió la activación de NF-κB2 inducida por TWEAK en el riñón, como lo demuestra la reducción de la acumulación de p52 y RelB nuclear en las células epiteliales tubulares. (Figuras 9C y 9D). Además, el paricalcitol inhibió las actividades de unión al ADN de p52 y RelB inducidas por TWEAK (Figura 9E).
10 En este sentido, la activación por TWEAK de la ruta de NF-κB2 en células tubulares conduce a la síntesis de quimiocinas específicas, como CCL21A y CCL19. En ratones inyectados con TWEAK, el paricalcitol redujo la expresión de los genes renales CCL21A y CCL19 (Figura 10A) y los niveles de proteína CCL21 (Figura 10B). Curiosamente, CCL21 se ubicó en los túbulos renales en ratones inyectados con TWEAK (Figuras 10C y 10D), es decir, en las mismas estructuras renales donde se ubicaron los componentes activos de NF-κB2 RelB y p52 (Figura 15). Estos datos sugieren que los efectos antiinflamatorios del paricalcitol podrían estar mediados por la modulación de los genes diana NF-κB2.

15 En ratones inyectados con TWEAK, la inhibición de la ruta de NF-κB2 con SN52, un péptido sintético que bloquea específicamente la translocación nuclear de la subunidad p52/NF-κB2 (Figuras 11A y 11B), disminuyó significativamente el número de monocitos/macrófagos infiltrantes (células F4/80⁺) y linfocitos T (CD3⁺) (Figuras 8A y 8B), mostrando así un claro efecto antiinflamatorio. Curiosamente, en ratones inyectados con TWEAK, SN52 impidió la regulación por incremento de varios genes proinflamatorios, incluidos los genes diana específicos de NF-κB2 CCL21A y CCL19 (Figura 8E), y se sabe que también están regulados por NF-κB1 (IL-6, CCL2, y CCL5) (Figura 8C). Estos datos demuestran claramente que la inhibición de NF-κB2 podría ser una opción terapéutica potencial para las enfermedades inflamatorias renales.

- Paricalcitol inhibe la ruta de NF-κB2 no canónica en la obstrucción ureteral unilateral experimental.

20 En la obstrucción ureteral unilateral (modelo UUO), el paricalcitol disminuye la infiltración de células inflamatorias renales y la expresión de CCL5 y CCL2, sin bloquear la translocación nuclear de p65/NF-κB1. Por lo tanto, se investigó si el paricalcitol modulaba la ruta de NF-κB2 en la UUO. El paricalcitol impidió el aumento de los niveles de RelB y su localización nuclear observados en riñones obstruidos (Figura 12A). Además, bloqueó el procesamiento de p100/p52 y la translocación nuclear de p52 y la actividad de unión al ADN (Figuras 12A, 12B). Por el contrario, la activación de NF-κB1, evaluada mediante la fosforilación de IκB α y la actividad de unión al ADN de p65/NF-κB, no se modificó en riñones obstruidos tratados con paricalcitol (Figura 12C). Es importante destacar que, en los riñones obstruidos, el paricalcitol impidió la infiltración de células inflamatorias y el aumento de la expresión de factores proinflamatorios, como CCL2, CCL5, IL6 (Figura 13B) y quimiocinas específicas reguladas por NF-κB2, incluidas CCL21A y CCL19 (Figura 13C).

25 45 • El paricalcitol inhibe la ruta de NF-κB2, pero no la de NF-κB1, en la lesión renal aguda experimental inducida por ácido fólico.

50 A continuación, se investigó el efecto del paricalcitol y la contribución relativa de la ruta de NF-κB2 al daño renal inducido por el ácido fólico (AF) en ratones. El paricalcitol solo bloqueó la activación de NF-κB2, según lo determinado por los niveles de RelB y p52, la translocación nuclear y la actividad de unión al ADN de RelB (Figuras 14A, 14B, 14E) y la expresión génica y proteica de las citocinas dependientes de NF-κB2, como CCL21A, así como otros factores proinflamatorios (Figuras 14F y 14G), mientras que la activación de NF-κB1, evaluada mediante fosforilación de IκB α , no se modificó (Figura 14C). Es importante destacar que el paricalcitol también impidió la infiltración de células inflamatorias renales (Figura 15). Estos datos sugieren que el paricalcitol protege de la lesión renal inducida por el ácido fólico al inhibir la inflamación y la ruta de NF-κB2 no canónica. Además, el paricalcitol también restableció los cambios en la función renal evaluados mediante los niveles séricos de BUN (Figura 14H), lo que muestra el efecto beneficioso de este VDRA en la fase aguda del daño renal en este modelo experimental de lesión renal.

60 60 Ejemplo 2.10. El paricalcitol inhibe la ruta de NF-κB2 independientemente de MARSS

65 Para probar la hipótesis de que MARSS podría ser un receptor de VDRA, se bloqueó MARSS mediante un enfoque de silenciamiento génico. Las células HK2 se transfecaron con un ARNip de MARSS o un ARNip de control y luego se pretrataron o no con paricalcitol antes de la estimulación con TWEAK. En las células con MARSS silenciado, el paricalcitol disminuyó la activación de NF-κB2 inducida por TWEAK, lo que sugiere un efecto de paricalcitol independiente de MARSS (Figura 16).

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para detectar enfermedad renal que comprende:
 - 5 a. determinar al menos el nivel de proteína TRAF3 en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de muestras de sangre obtenidas del paciente,
 - 10 b. en el que si el nivel determinado en el paso (a) es estadísticamente inferior al nivel determinado en sujetos de control sanos, esto es una indicación de que el paciente padece enfermedad renal.
- 10 2. Método *in vitro* según la reivindicación 1, en el que la enfermedad renal se manifiesta clínicamente como lesión renal aguda (LRA) o enfermedad renal crónica (ERC), o la enfermedad renal ha progresado a enfermedad renal terminal (ERT).
- 15 3. Método *in vitro* para decidir o recomendar si se debe tratar a pacientes que padecen enfermedad renal con análogos o derivados de la vitamina D que comprende:
 - 20 a. determinar al menos el nivel de proteína TRAF3 en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de muestras de sangre obtenidas del paciente,
 - 25 b. en el que si el nivel determinado en el paso (a) es estadísticamente inferior al nivel determinado en sujetos de control sanos, se recomienda un tratamiento con análogos o derivados de la vitamina D.
- 25 4. Método *in vitro* para predecir la respuesta de pacientes que padecen enfermedad renal a un tratamiento con análogos o derivados de la vitamina D que comprende:
 - 30 a. determinar al menos el nivel de proteína TRAF3 en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de muestras de sangre obtenidas de pacientes antes de la administración del análogo o derivado de la vitamina D,
 - 35 b. en el que si el nivel determinado en el paso (a) es estadísticamente inferior al nivel de expresión determinado tras la administración de los análogos o derivados de la vitamina D, esto es una indicación de que el paciente responde al tratamiento.
- 35 5. Método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 4, en el que la enfermedad renal se manifiesta clínicamente como lesión renal aguda (LRA) o enfermedad renal crónica (ERC), o la enfermedad renal ha progresado a enfermedad renal terminal (ERT).
- 40 6. Método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en el que el análogo o derivado de la vitamina D se selecciona del grupo que comprende: paricalcitol, calcitriol, calcidiol, alfacalcidiol, tacalcitol, calcifediol, calcipotriol, maxacalcitol, doxercalciferol y/o falecalcitriol.
- 45 7. Uso *in vitro* del nivel de proteína TRAF3 determinado en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de muestras de sangre obtenidas del paciente para detectar la enfermedad renal, para predecir la respuesta de los pacientes que padecen enfermedad renal a un tratamiento con análogos o derivados de la vitamina D, o para decidir o recomendar si se debe tratar a los pacientes que padecen enfermedad renal con análogos o derivados de la vitamina D.

Figura 1

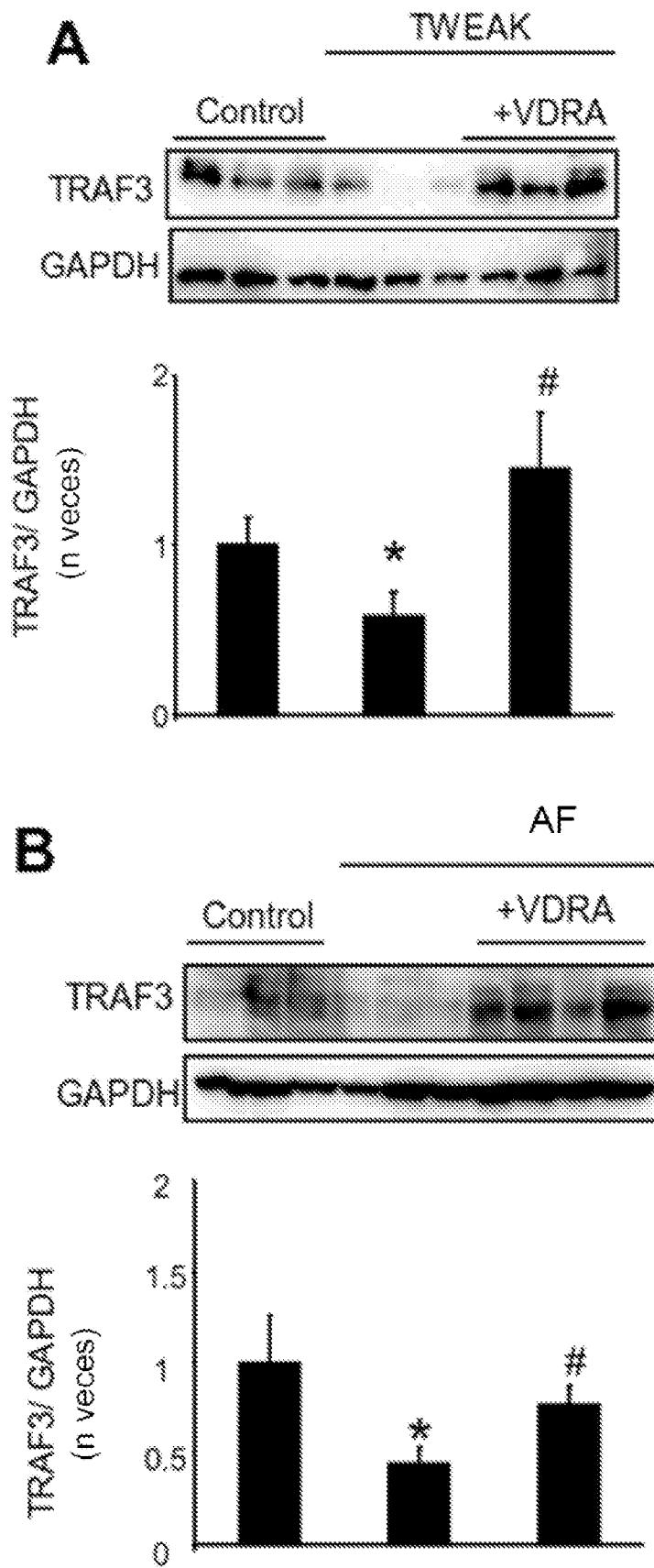


Figura 1 (cont.)

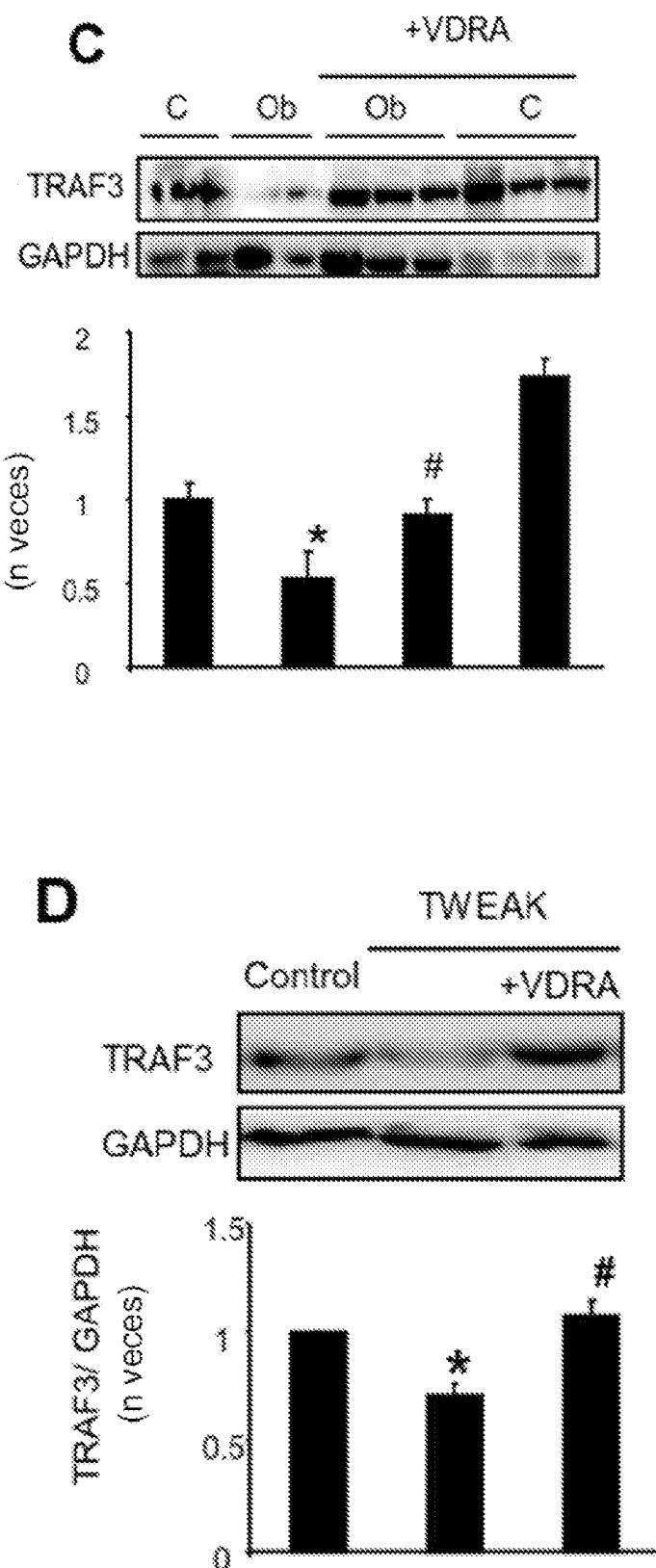


Figura 1 (cont.)

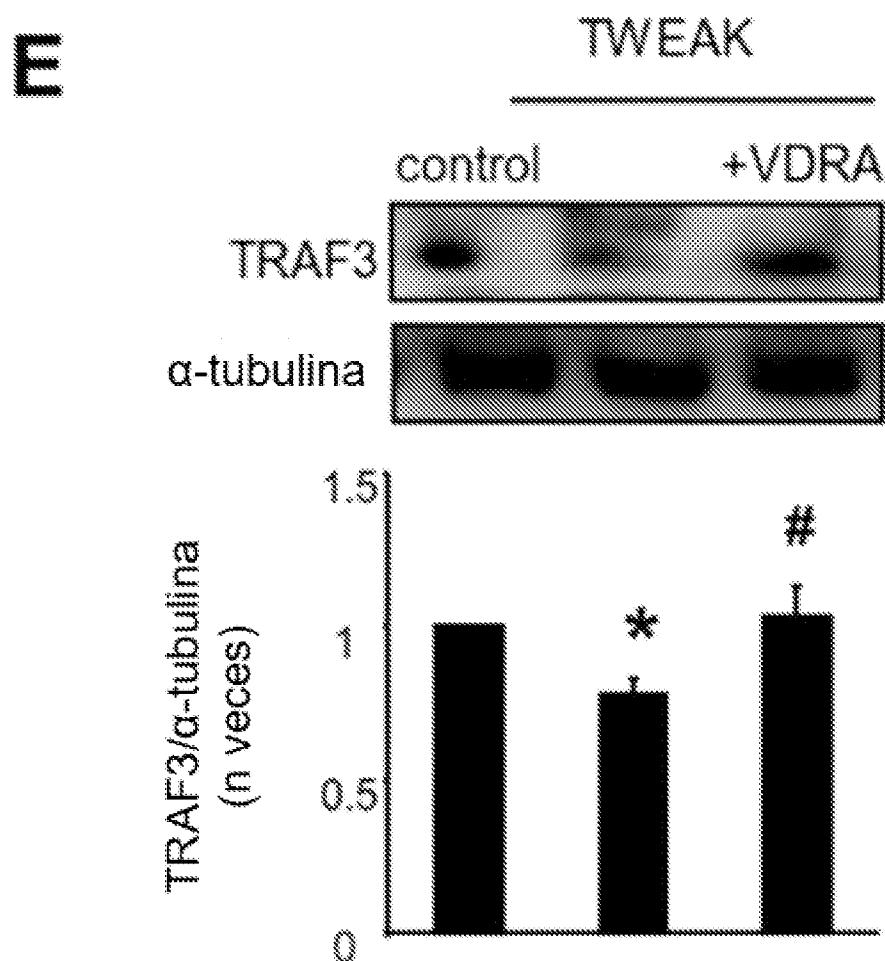


Figura 2

A

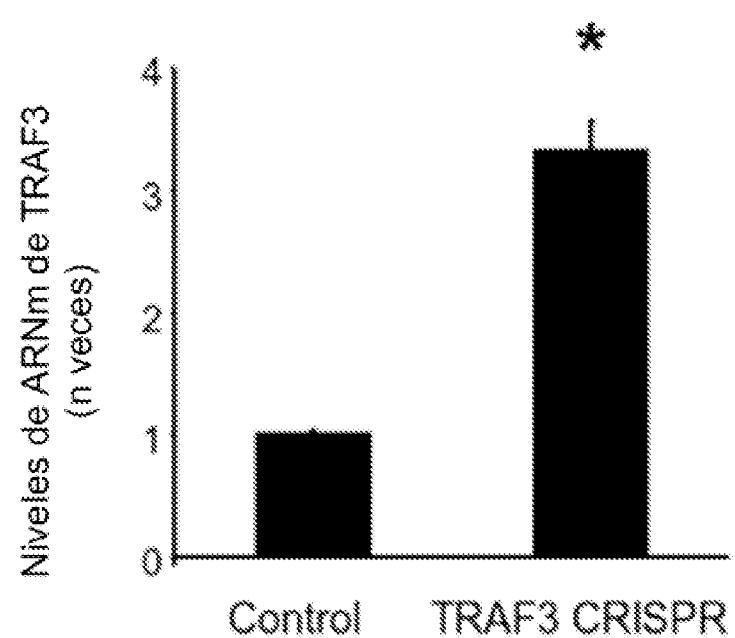


Figura 2 (cont.)

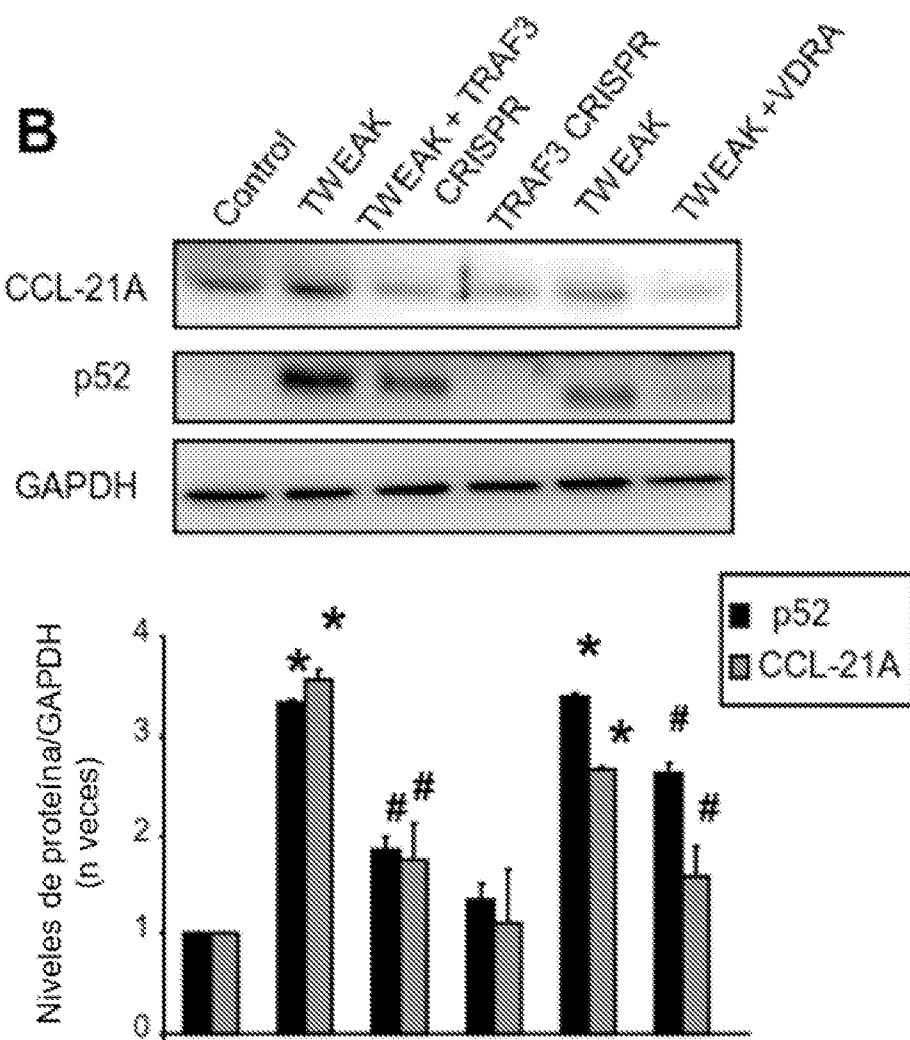


Figura 2 (cont.)

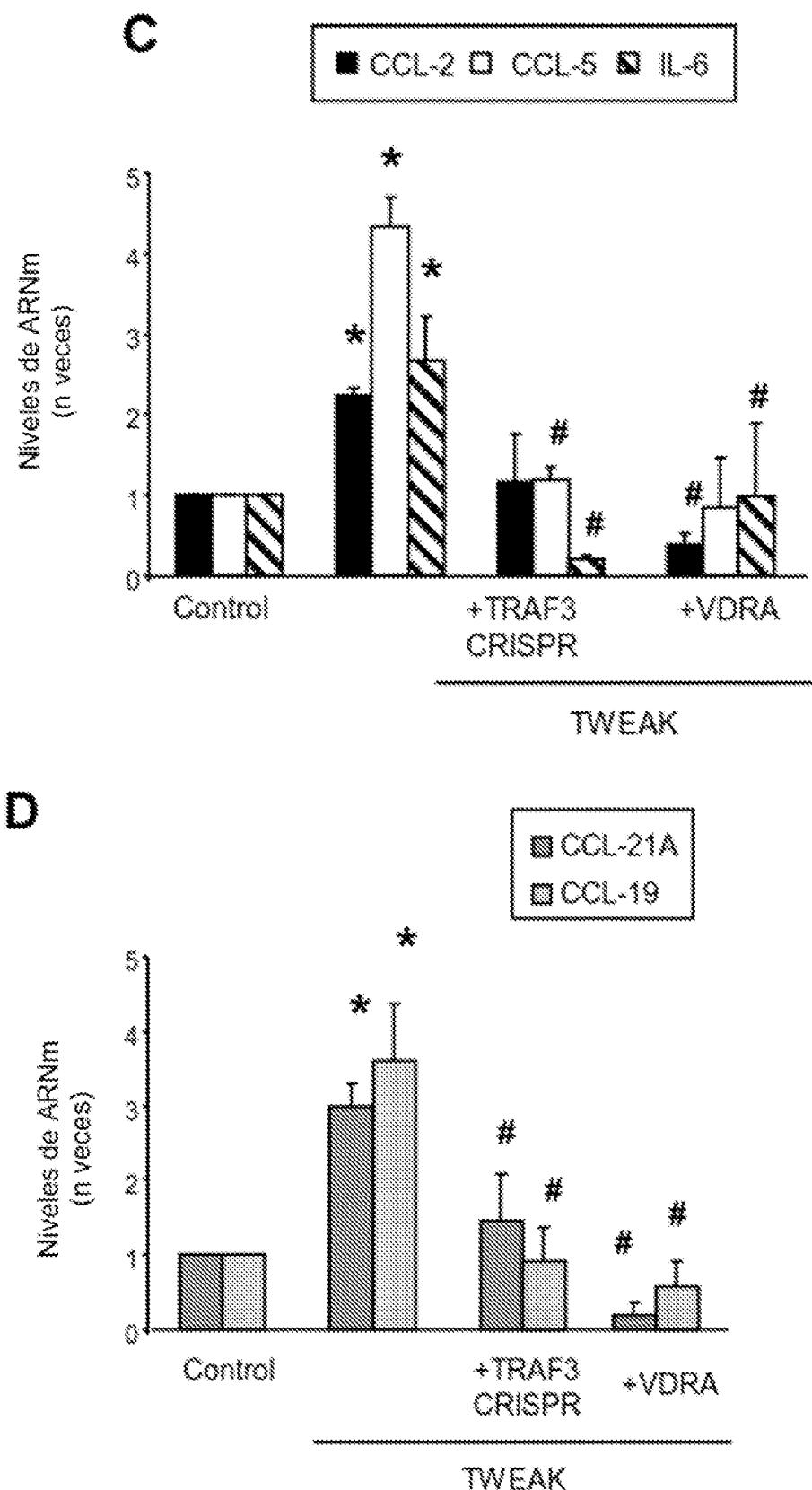


Figura 3

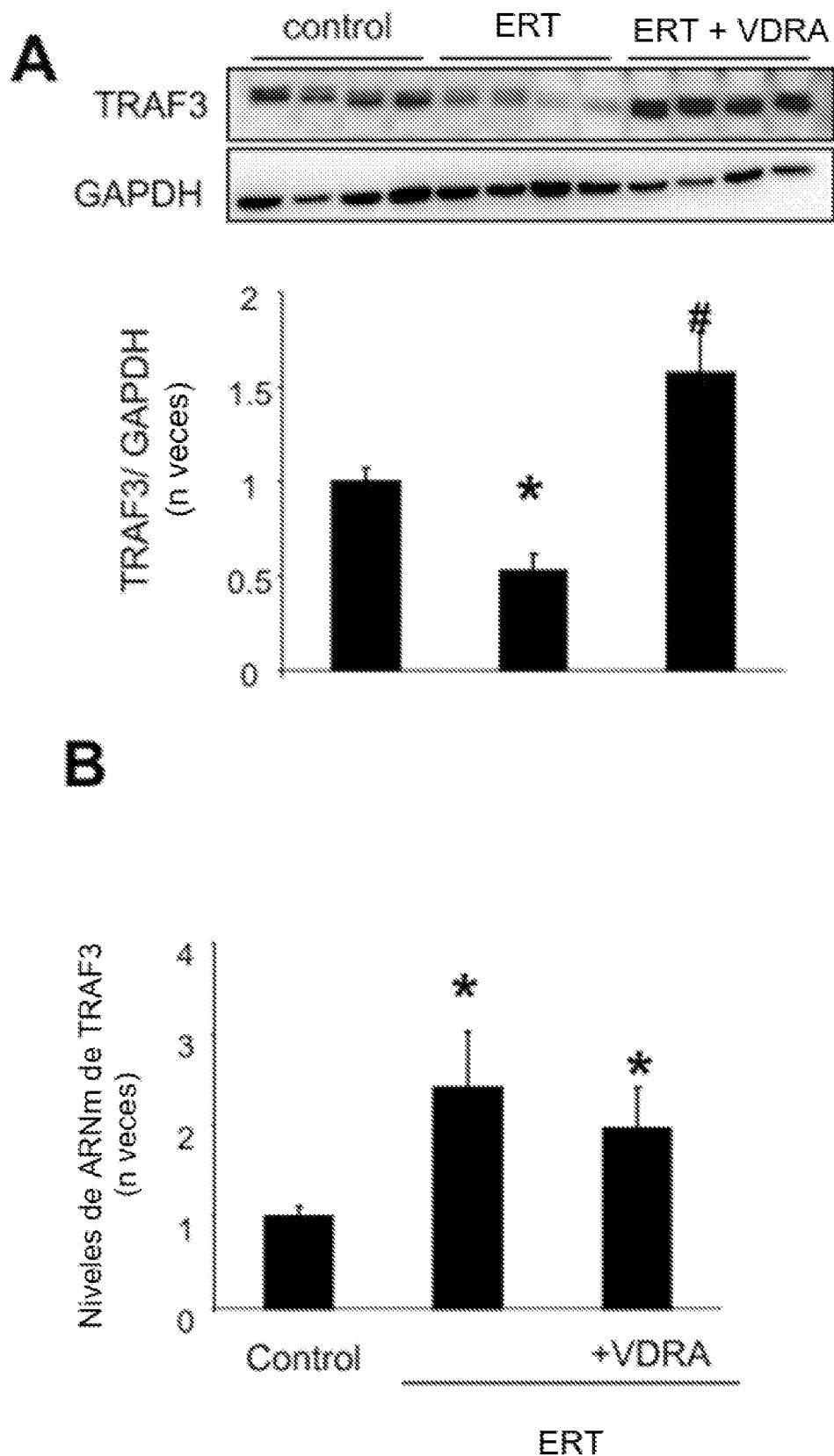


Figura 4

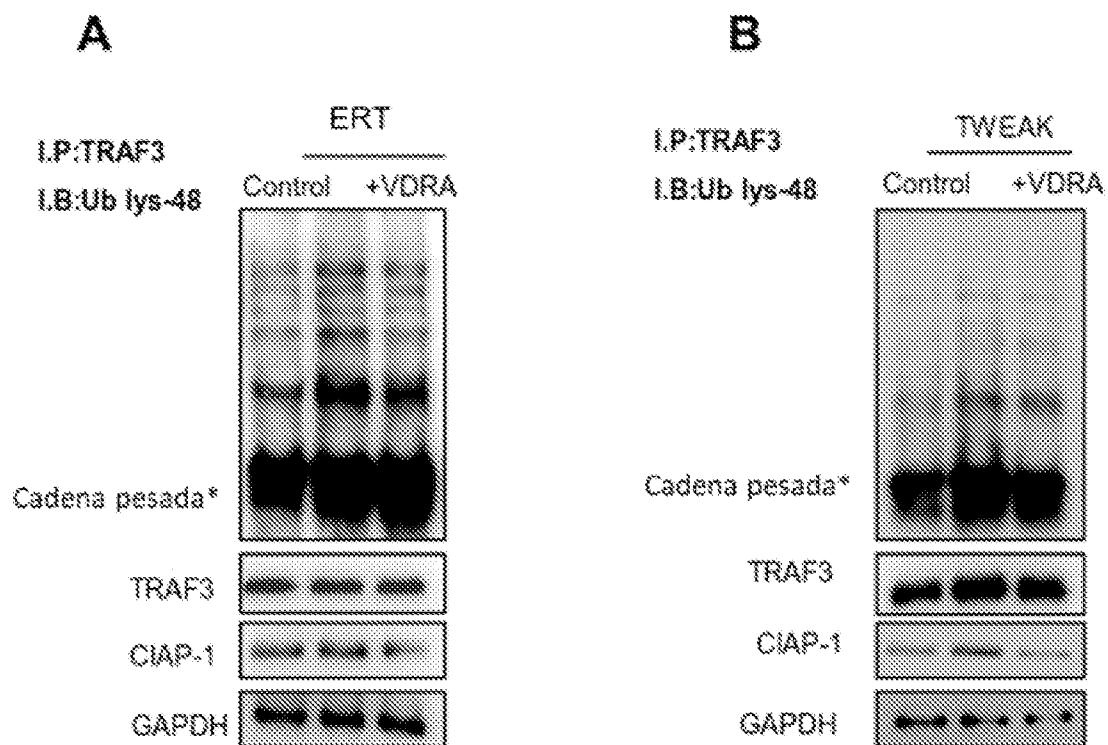


Figura 5

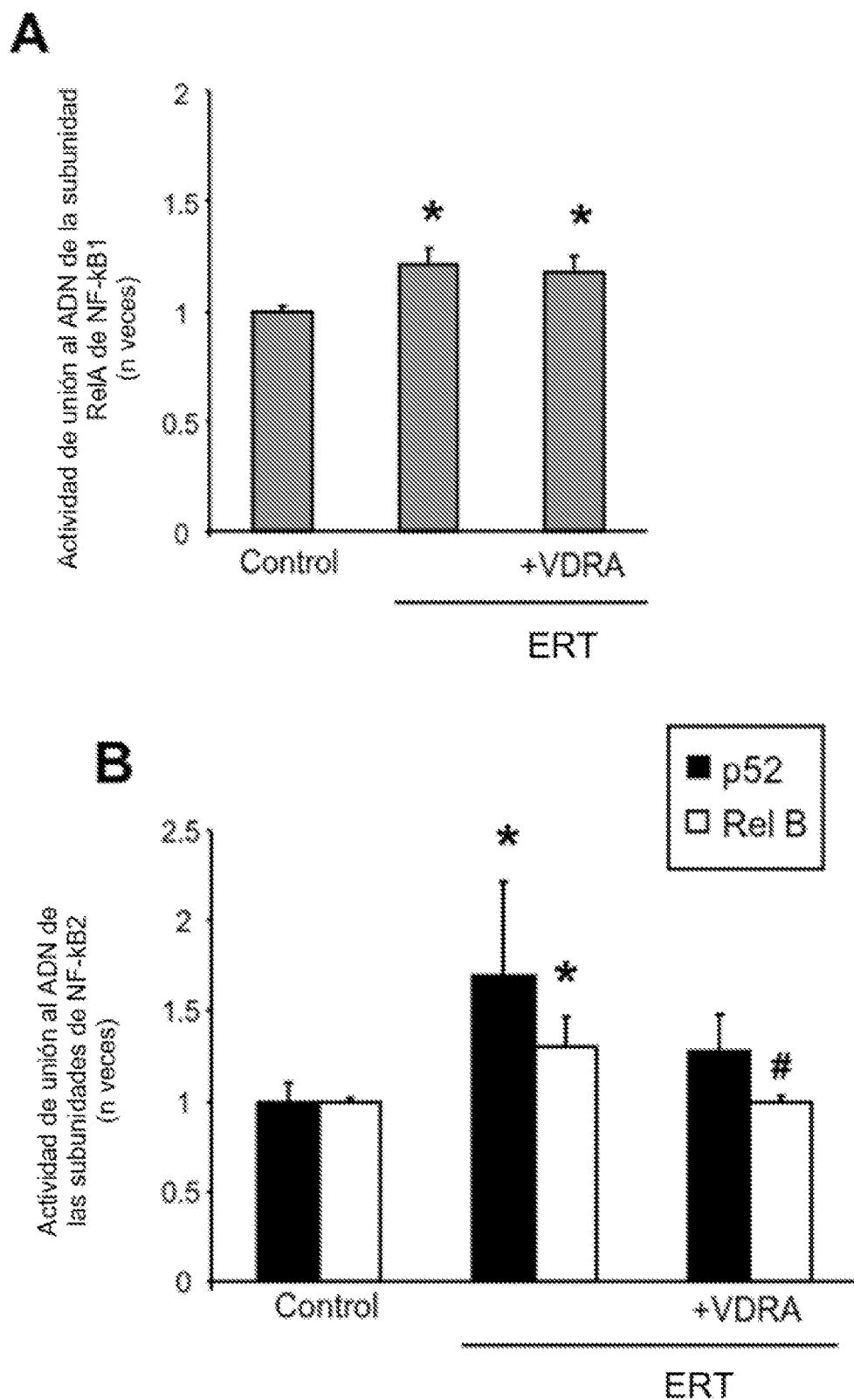


Figura 5 (cont.)

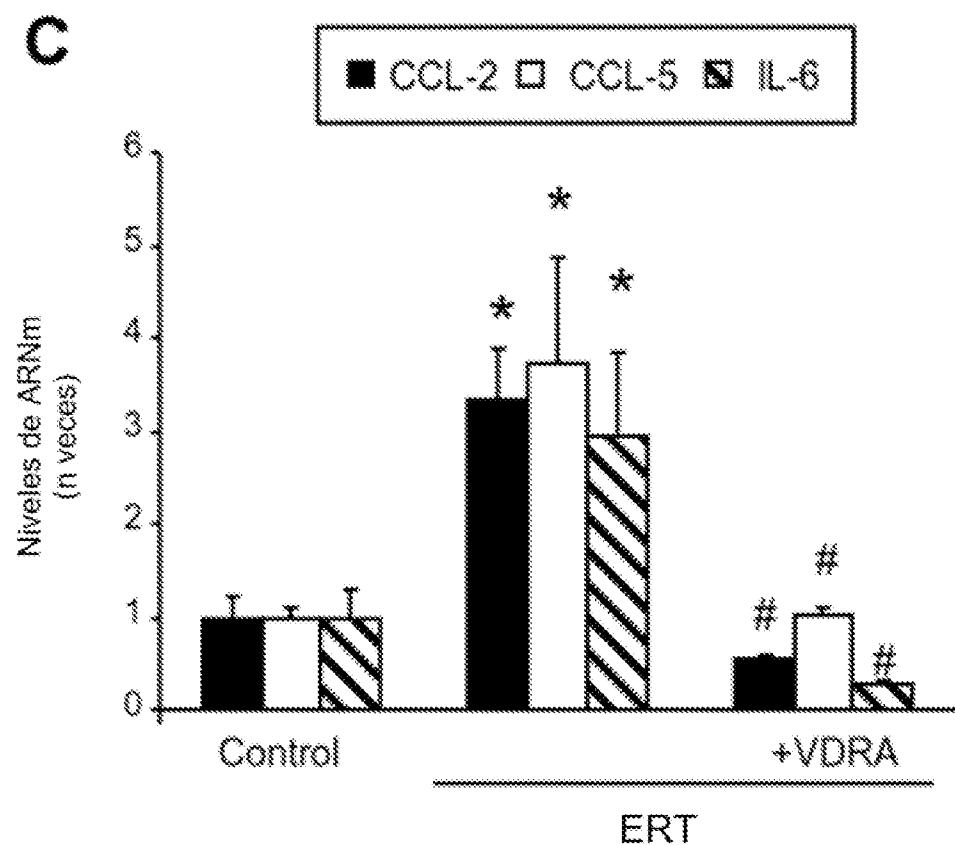


Figura 6

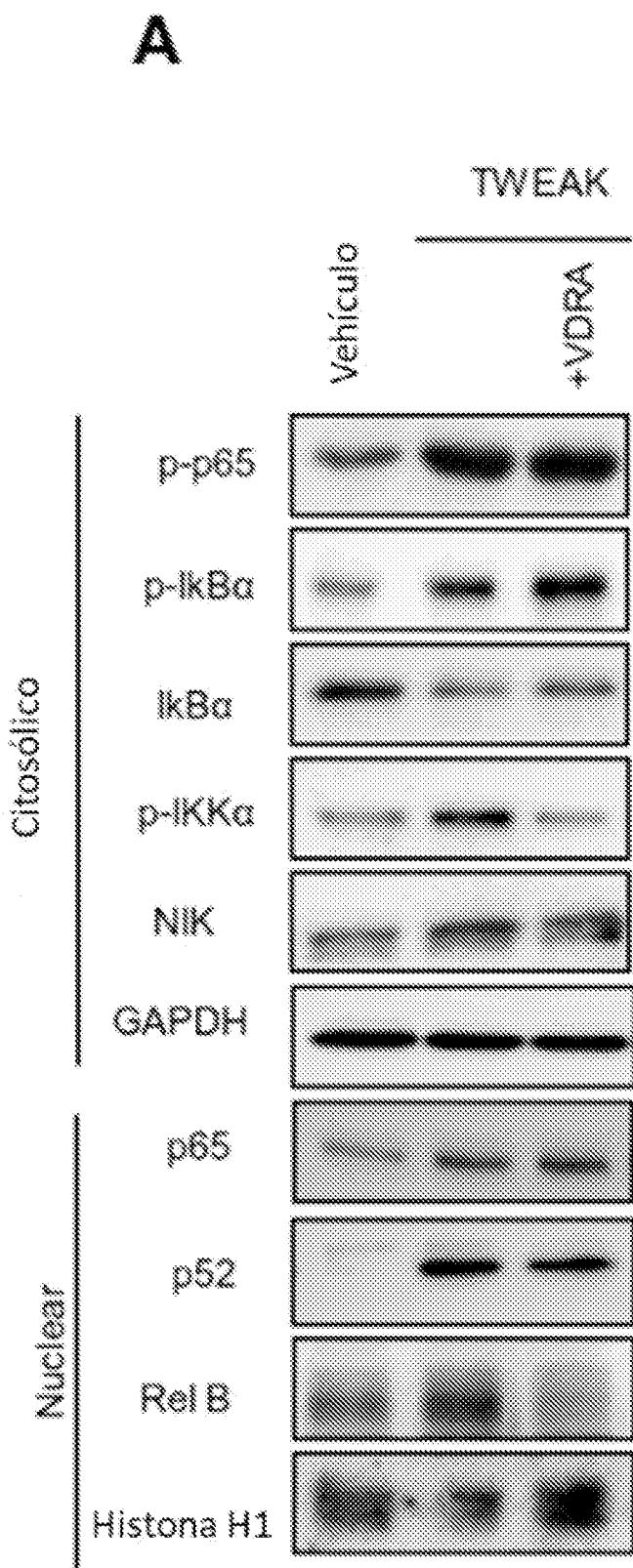


Figura 6 (cont.)

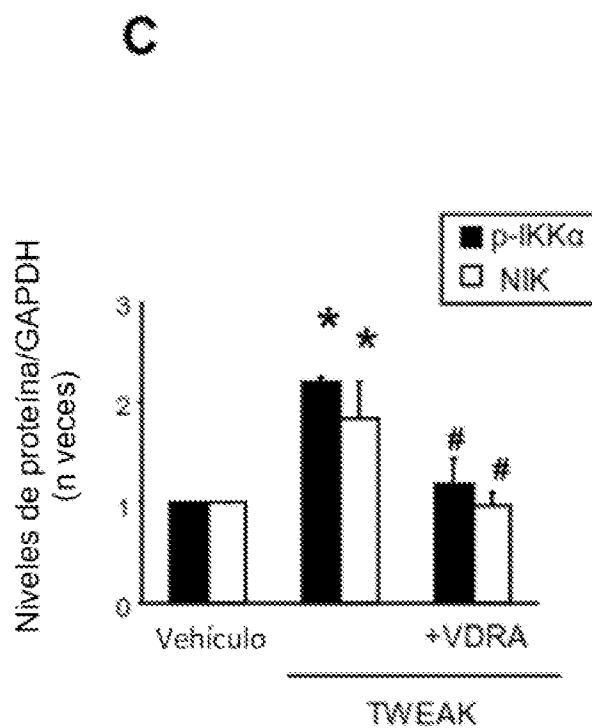
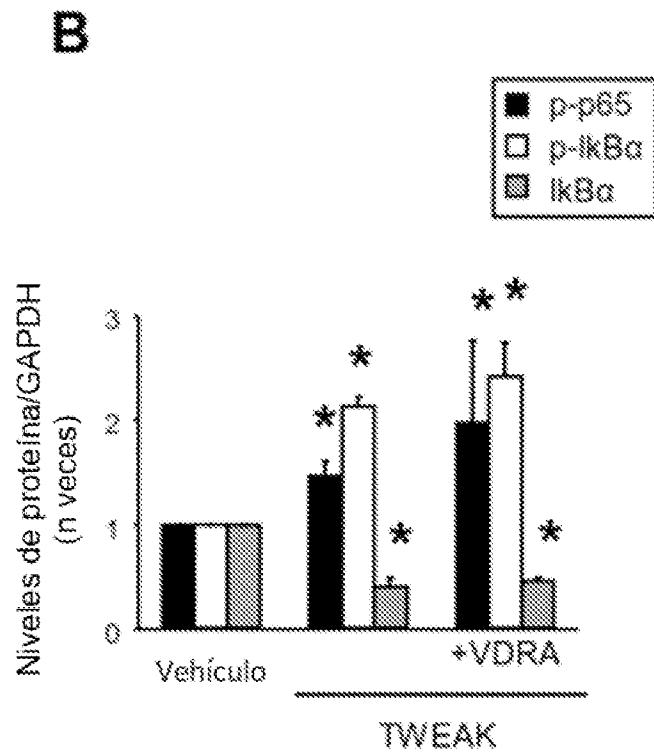


Figura 6 (cont.)

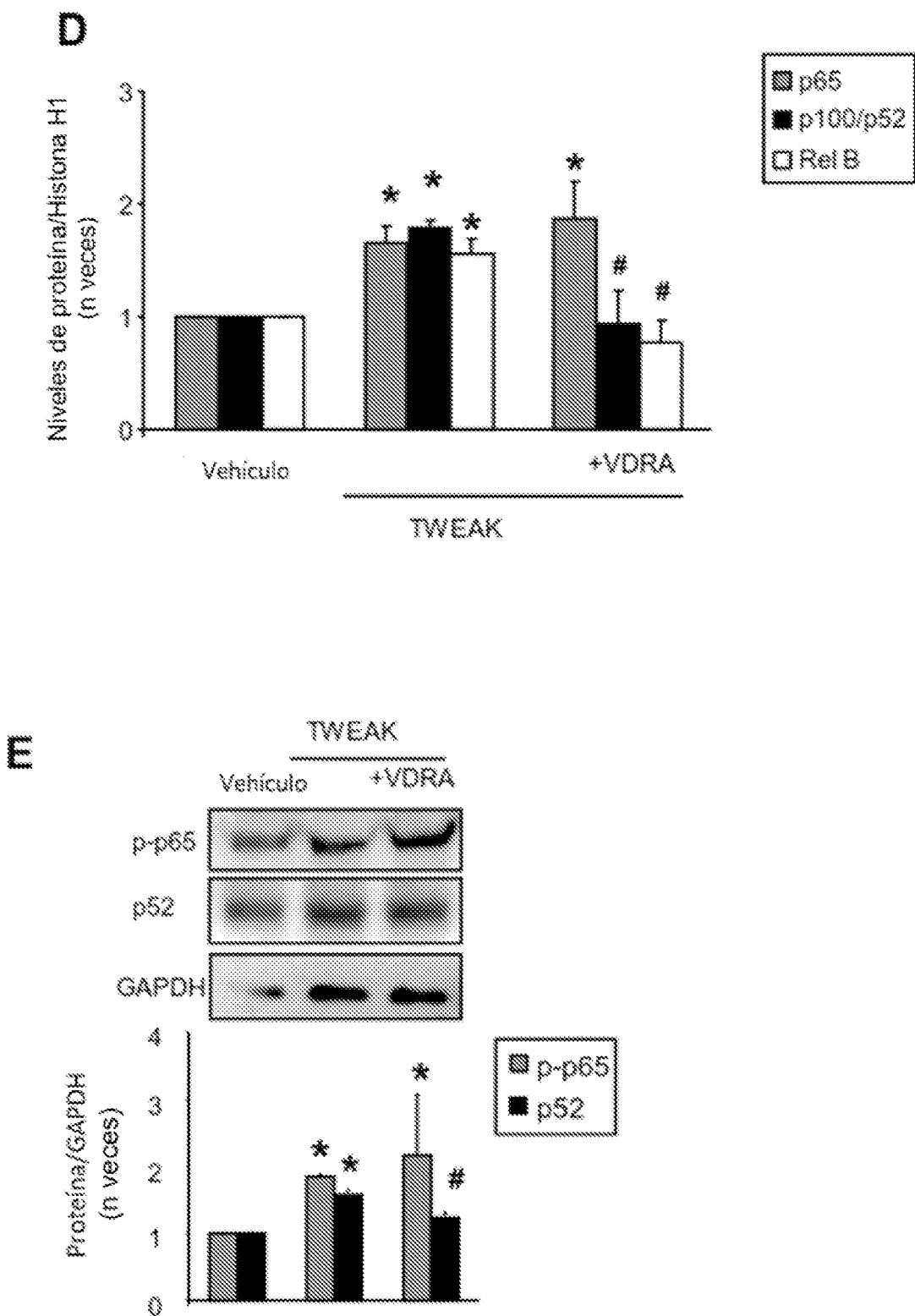


Figura 7

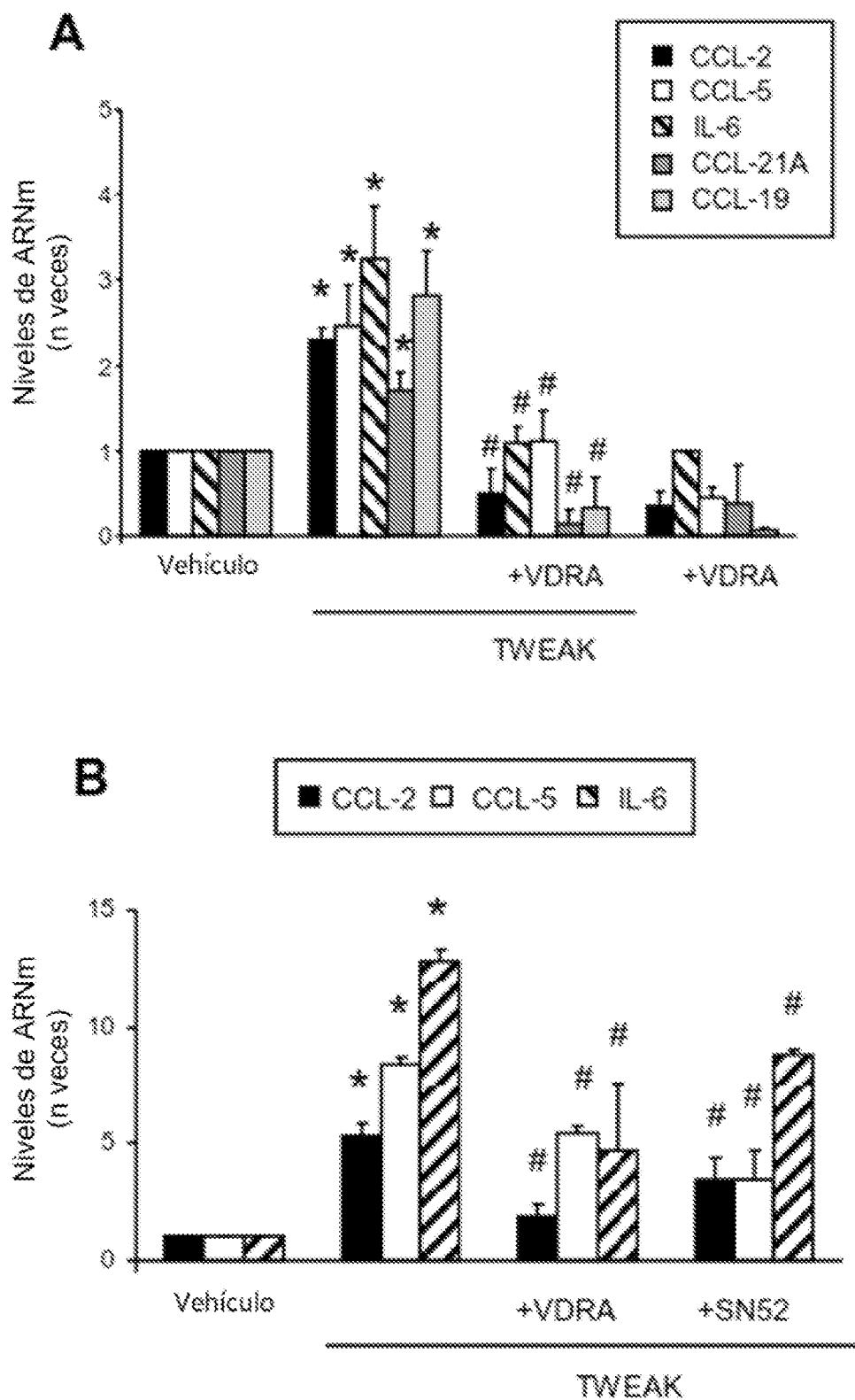


Figura 7 (cont.)

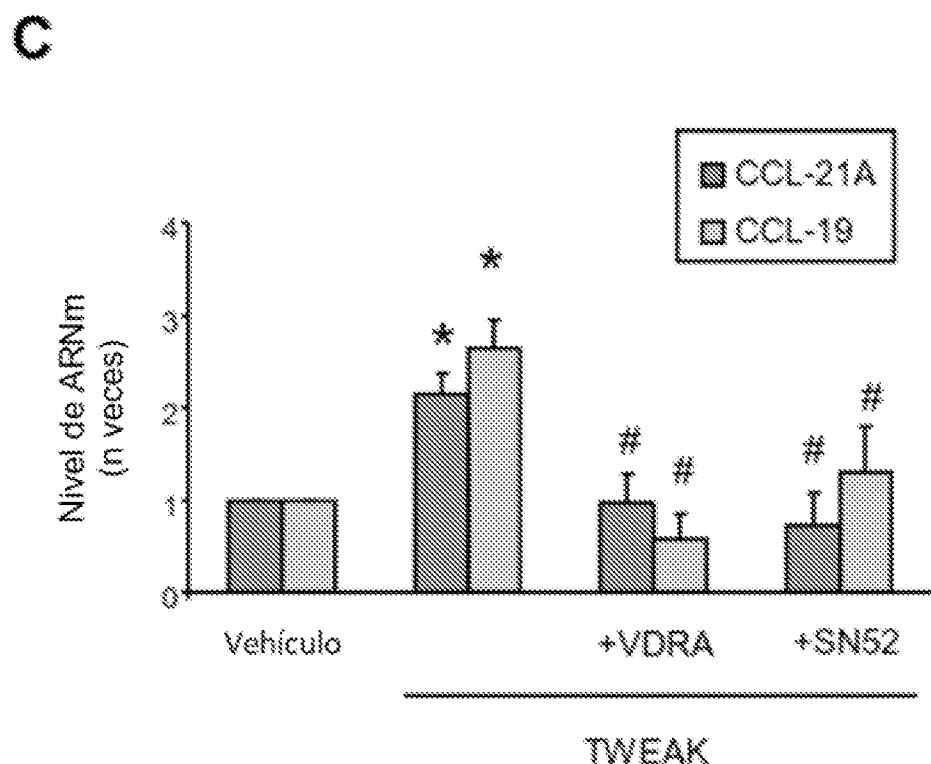


Figura 8

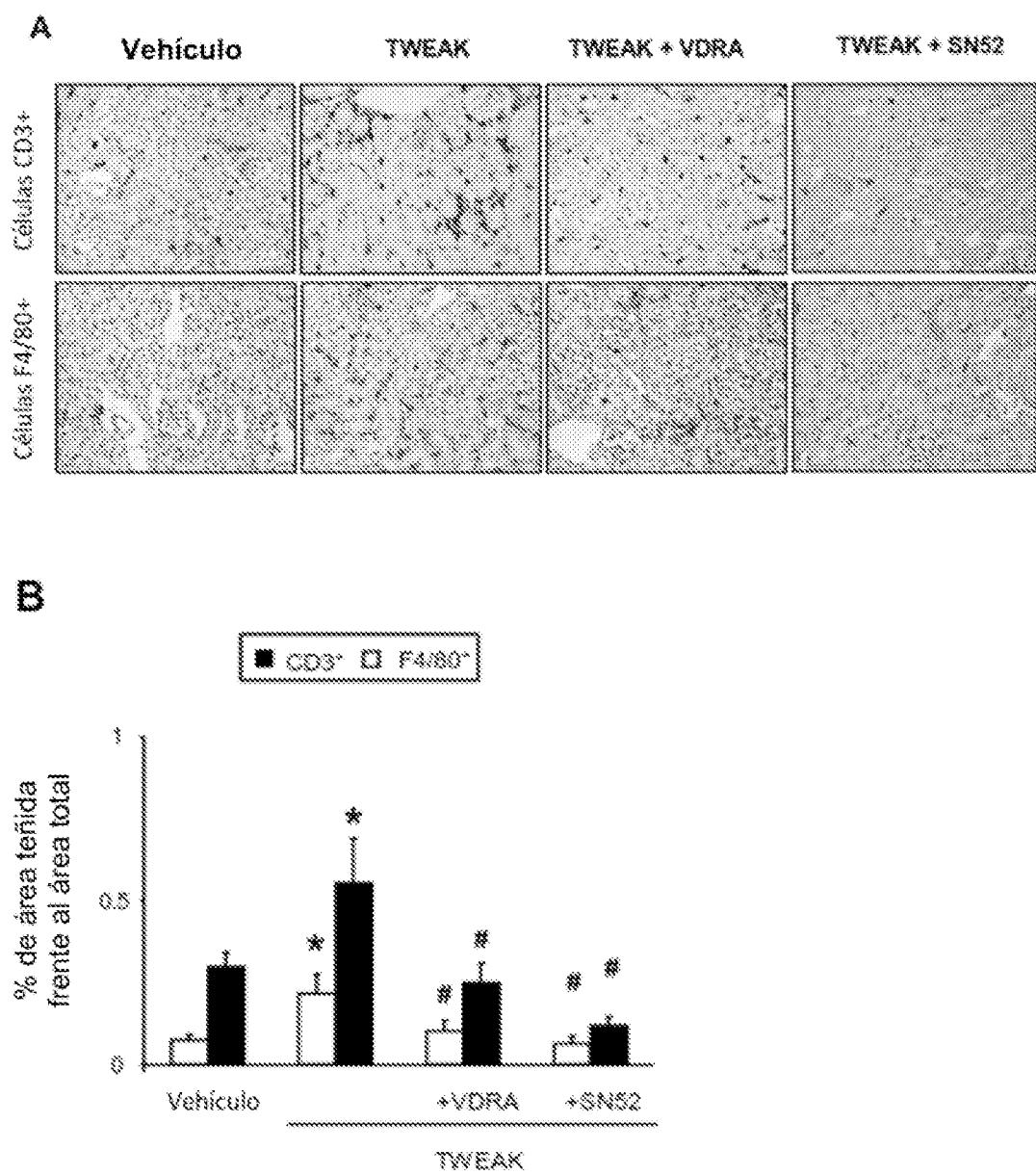


Figura 8 (cont.)

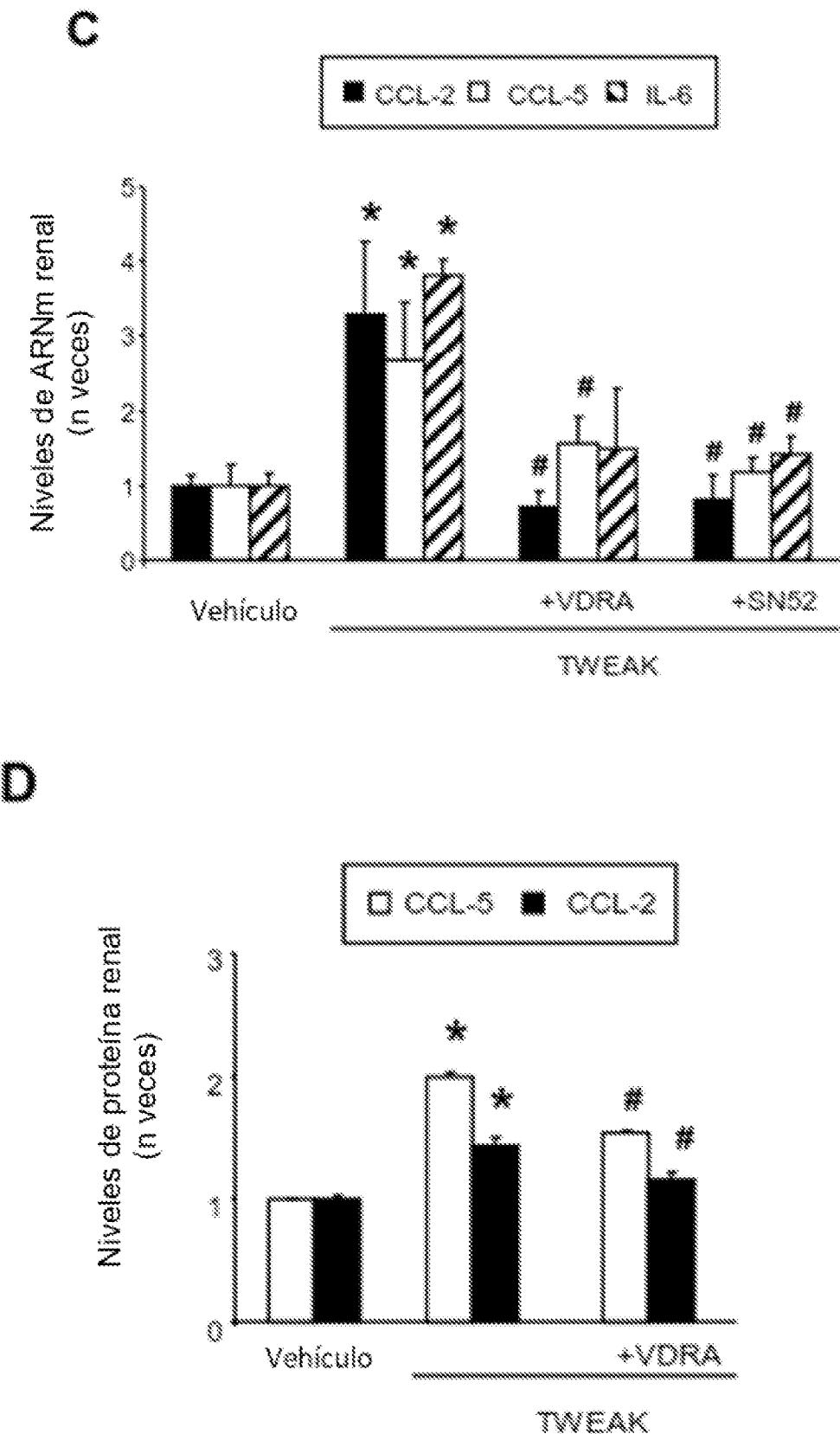


Figura 8 (cont.)

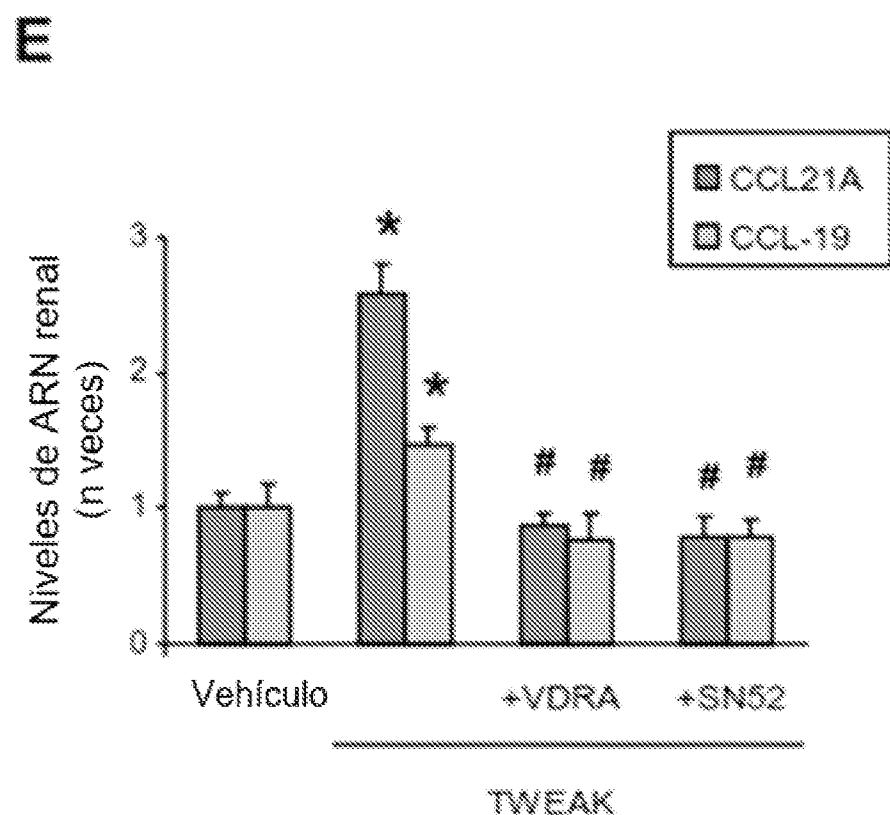


Figura 9

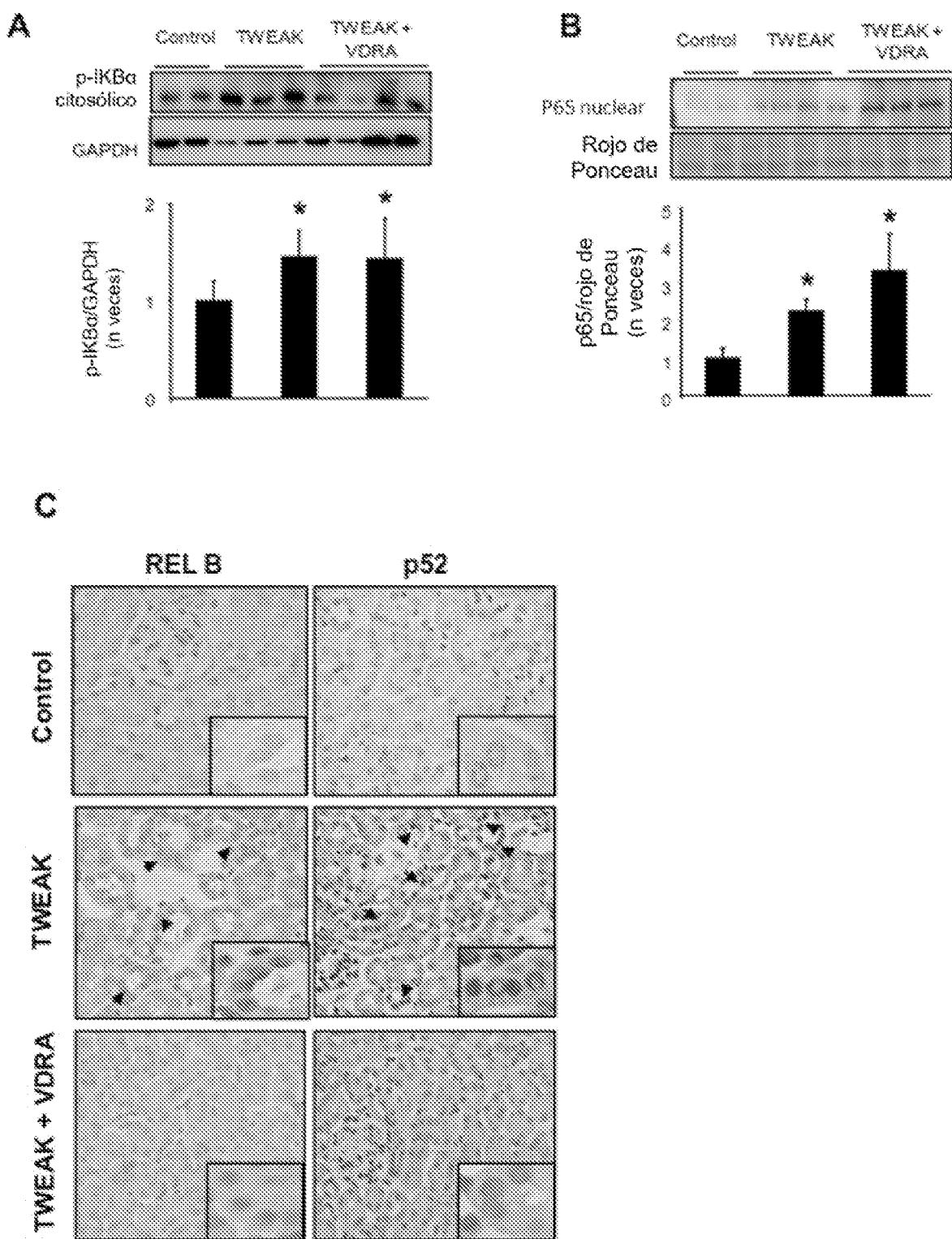


Figura 9 (cont.)

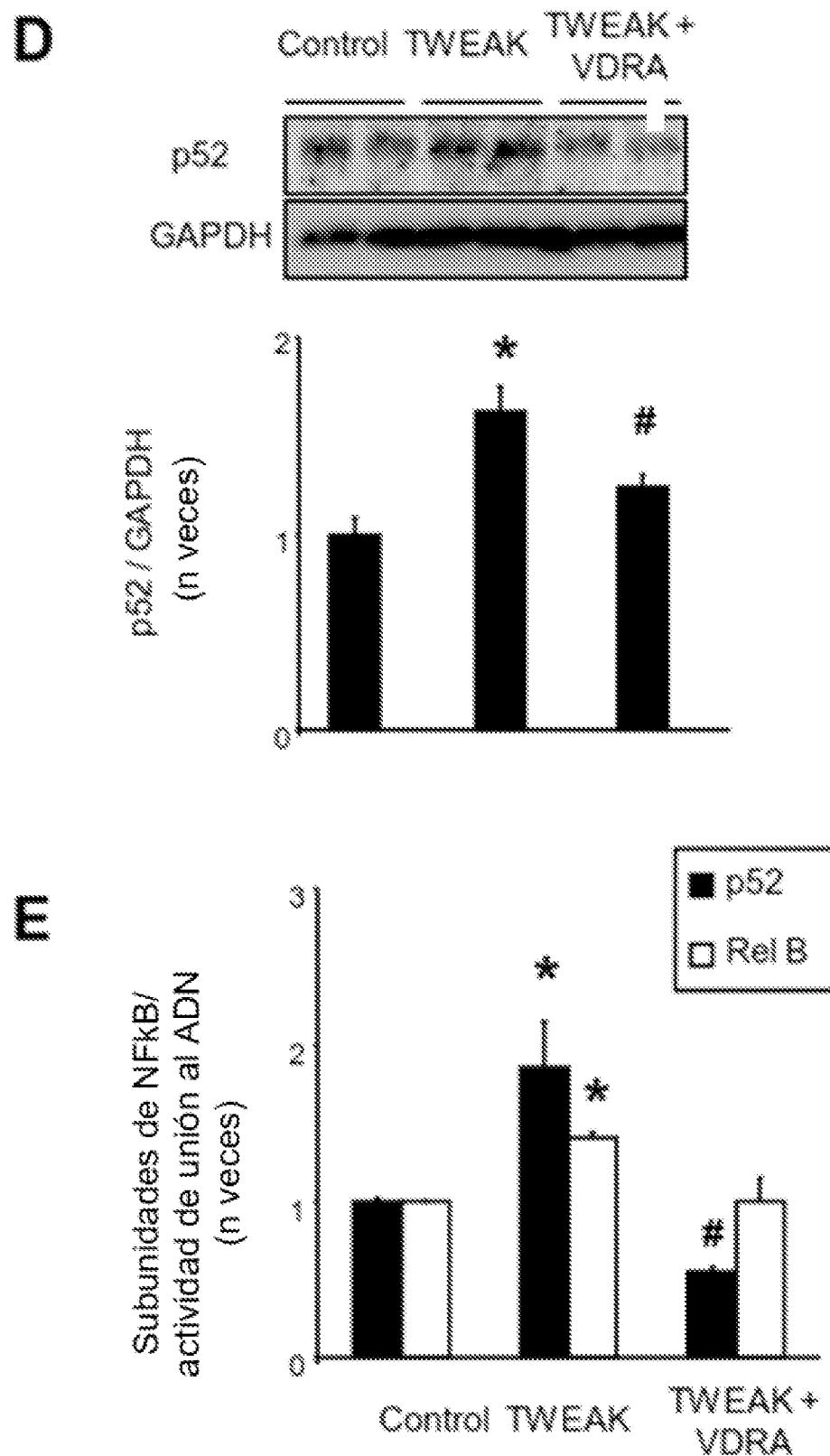


Figura 10

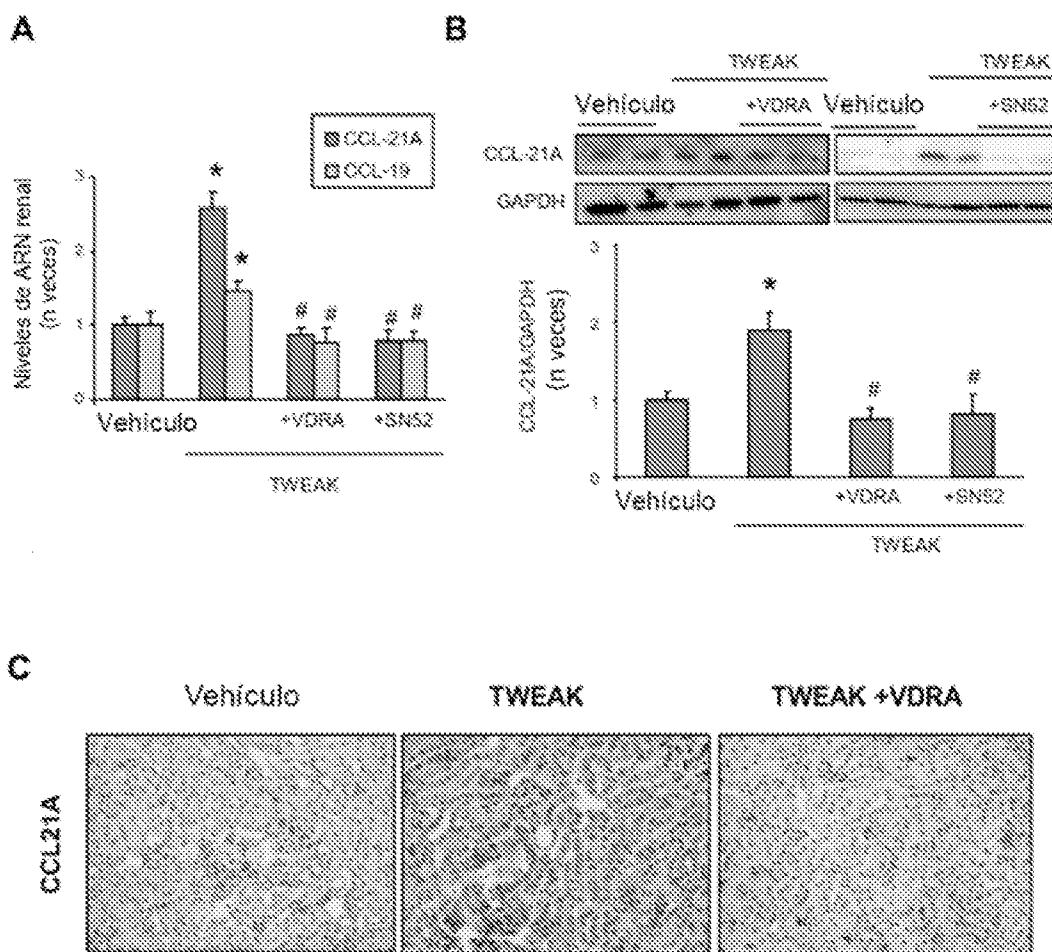


Figura 10 (cont.)

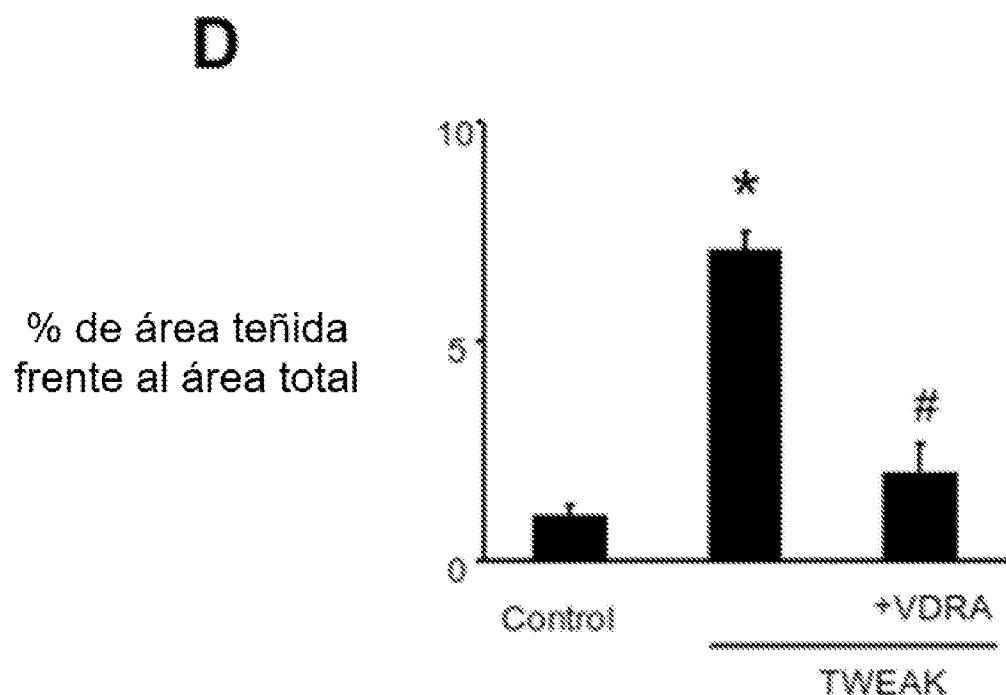


Figura 11

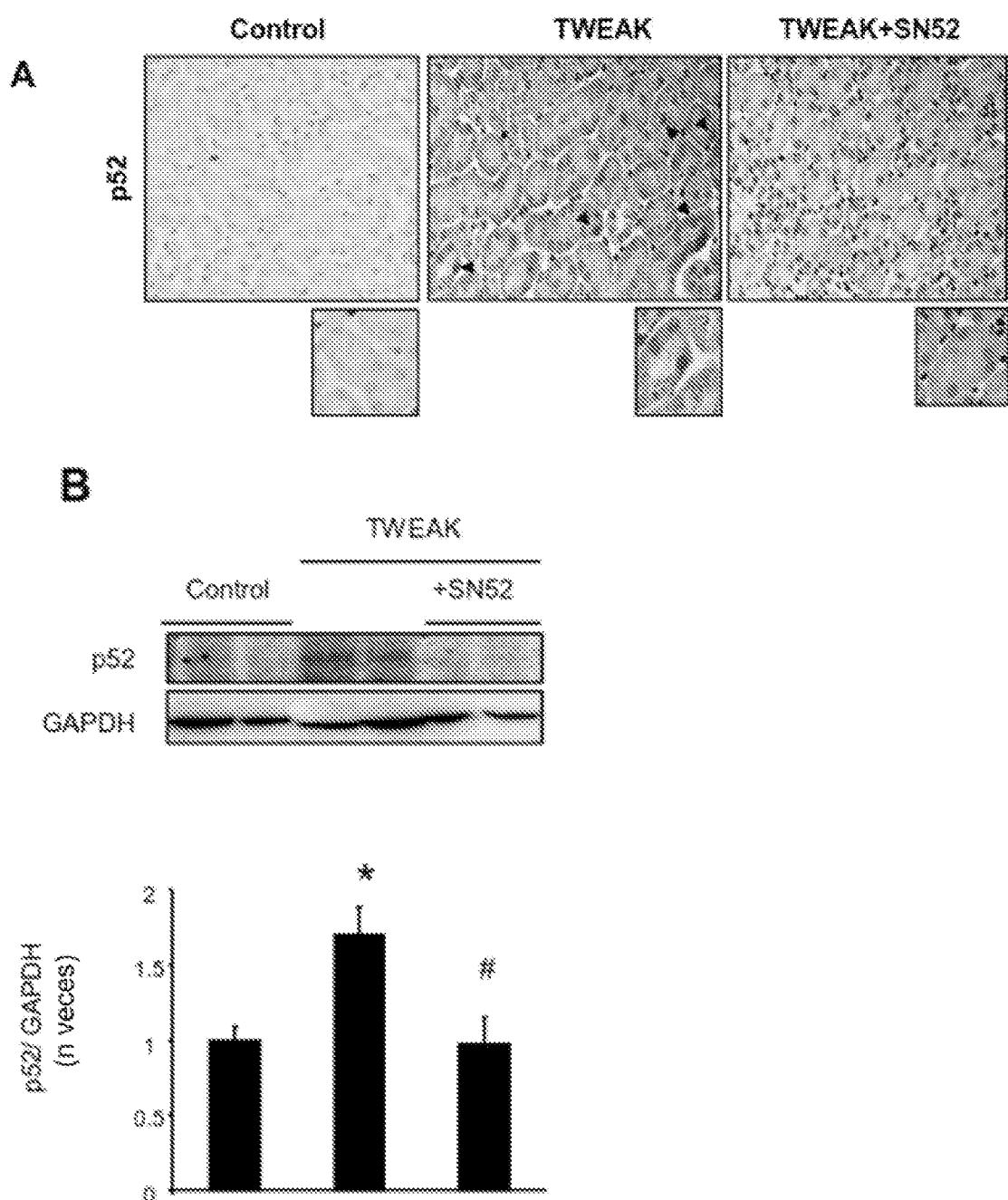


Figura 11 (cont.)

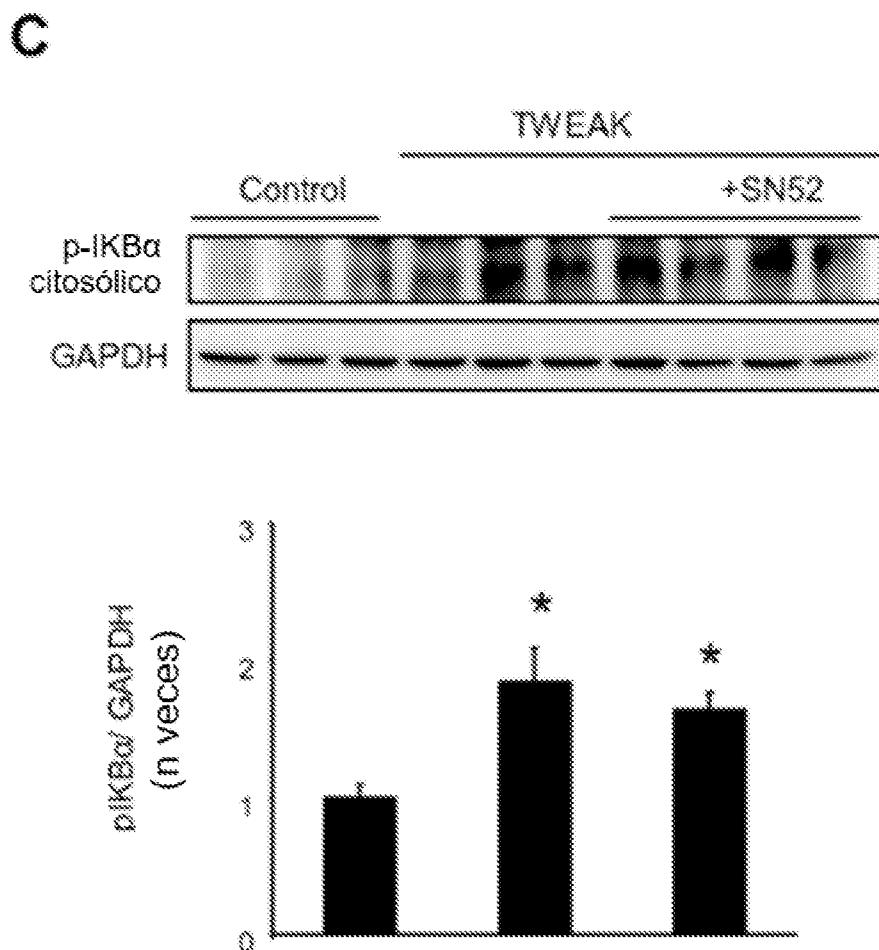


Figura 12

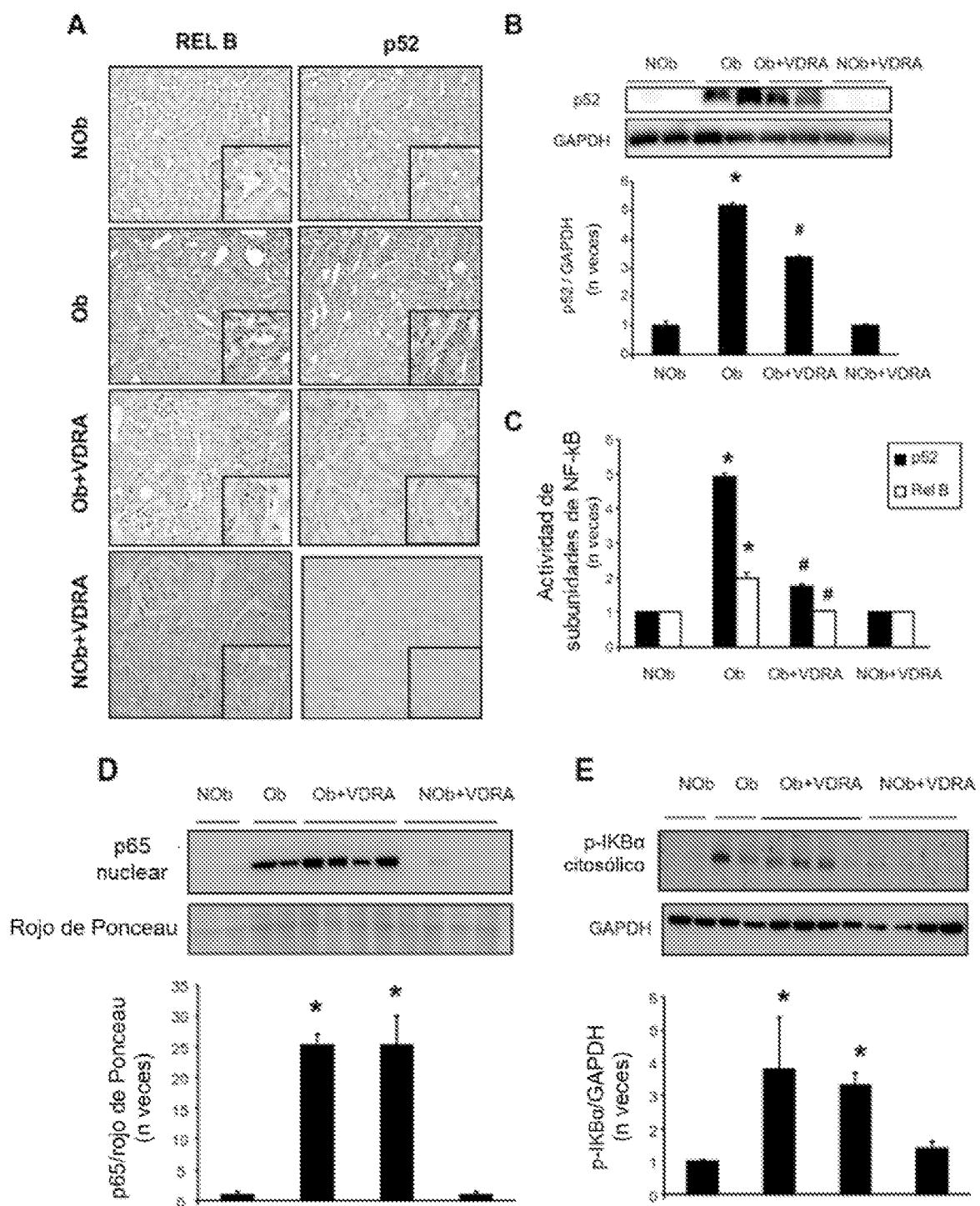


Figura 13

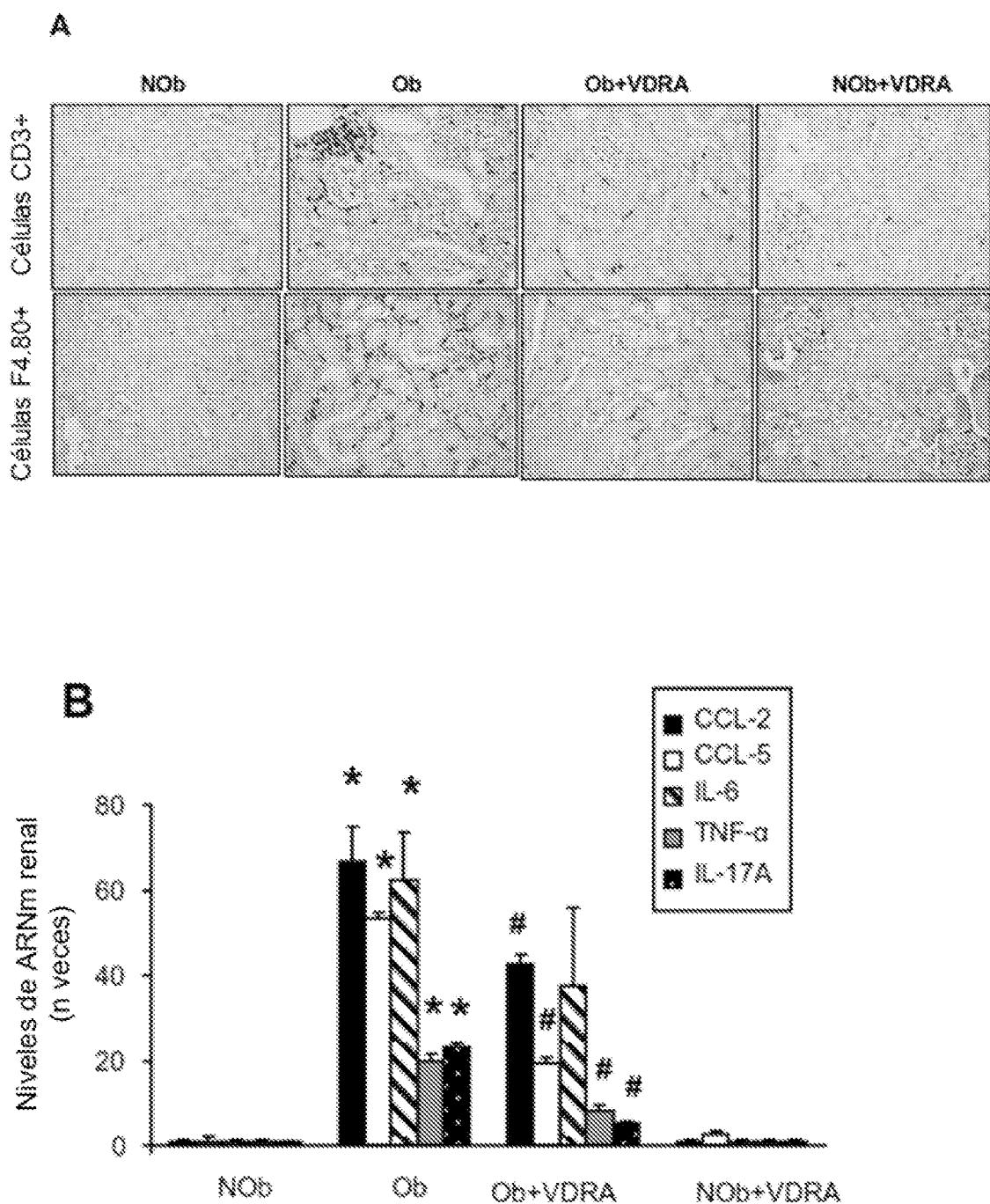


Figura 13 (cont.)

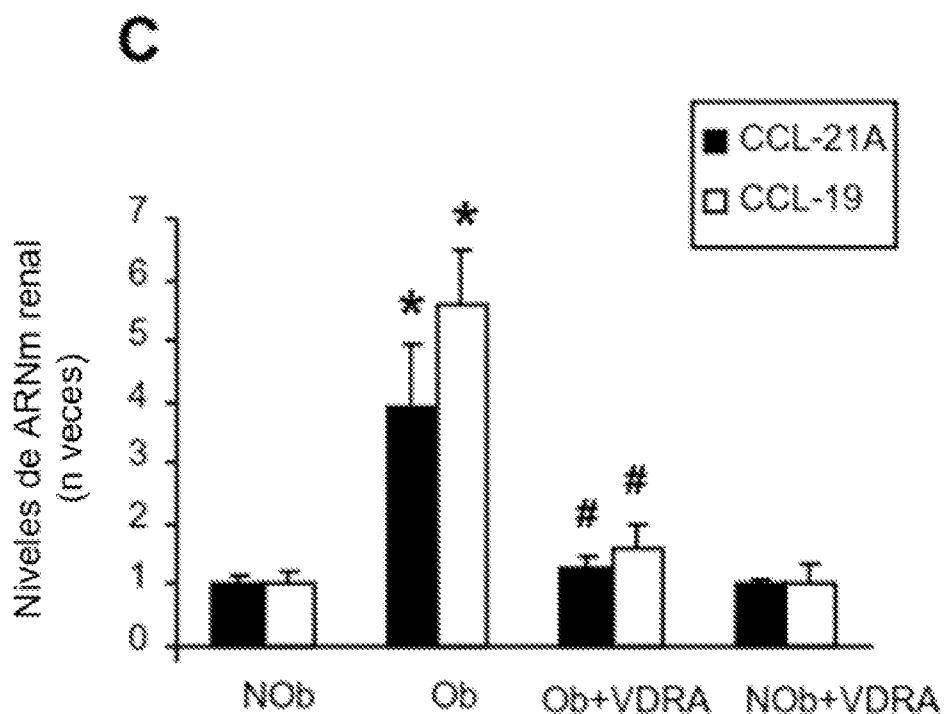


Figura 14

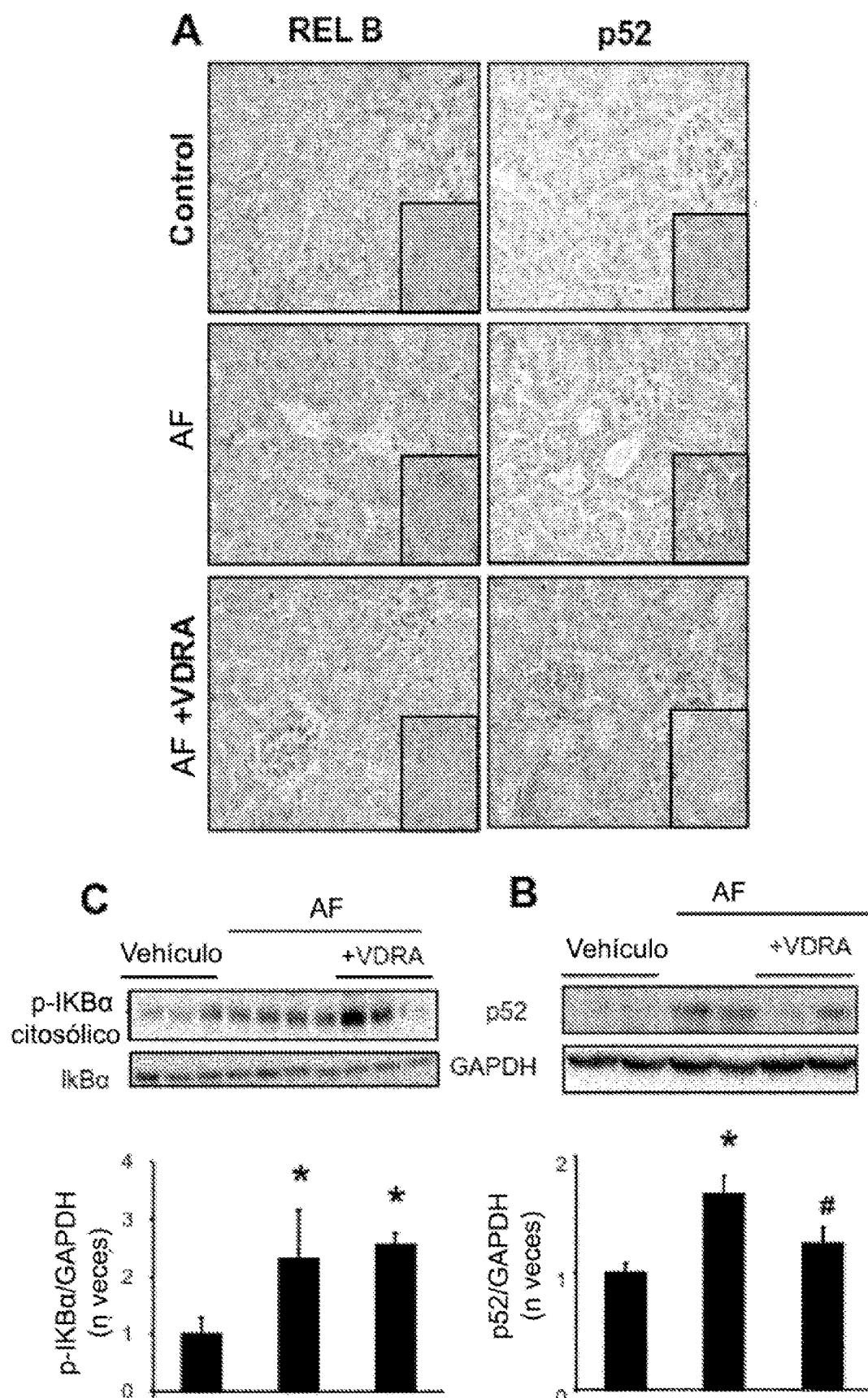
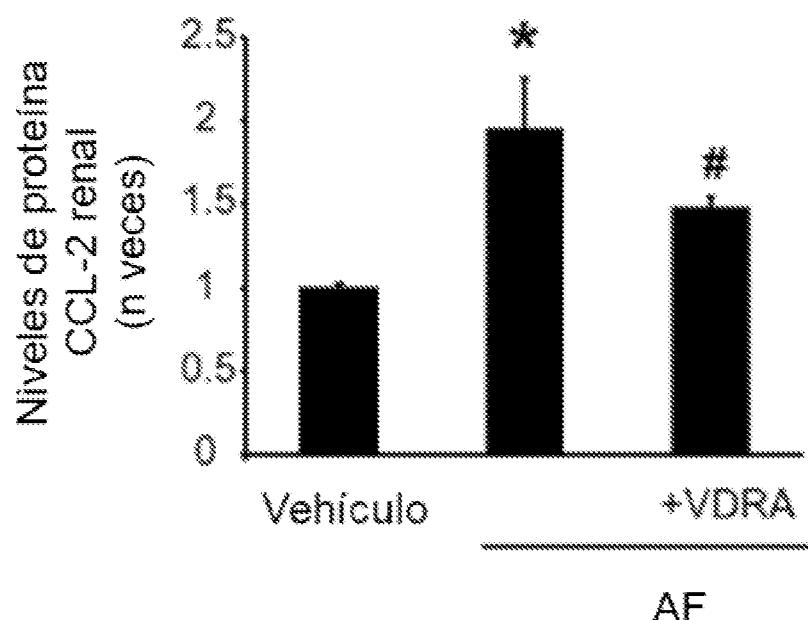


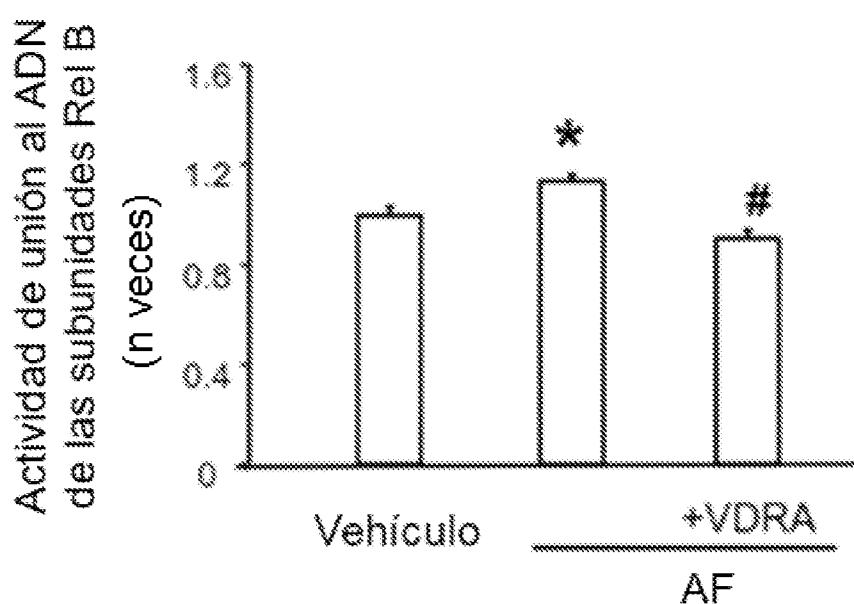
Figura 14 (cont.)

D



AF

E



AF

Figura 14 (cont.)

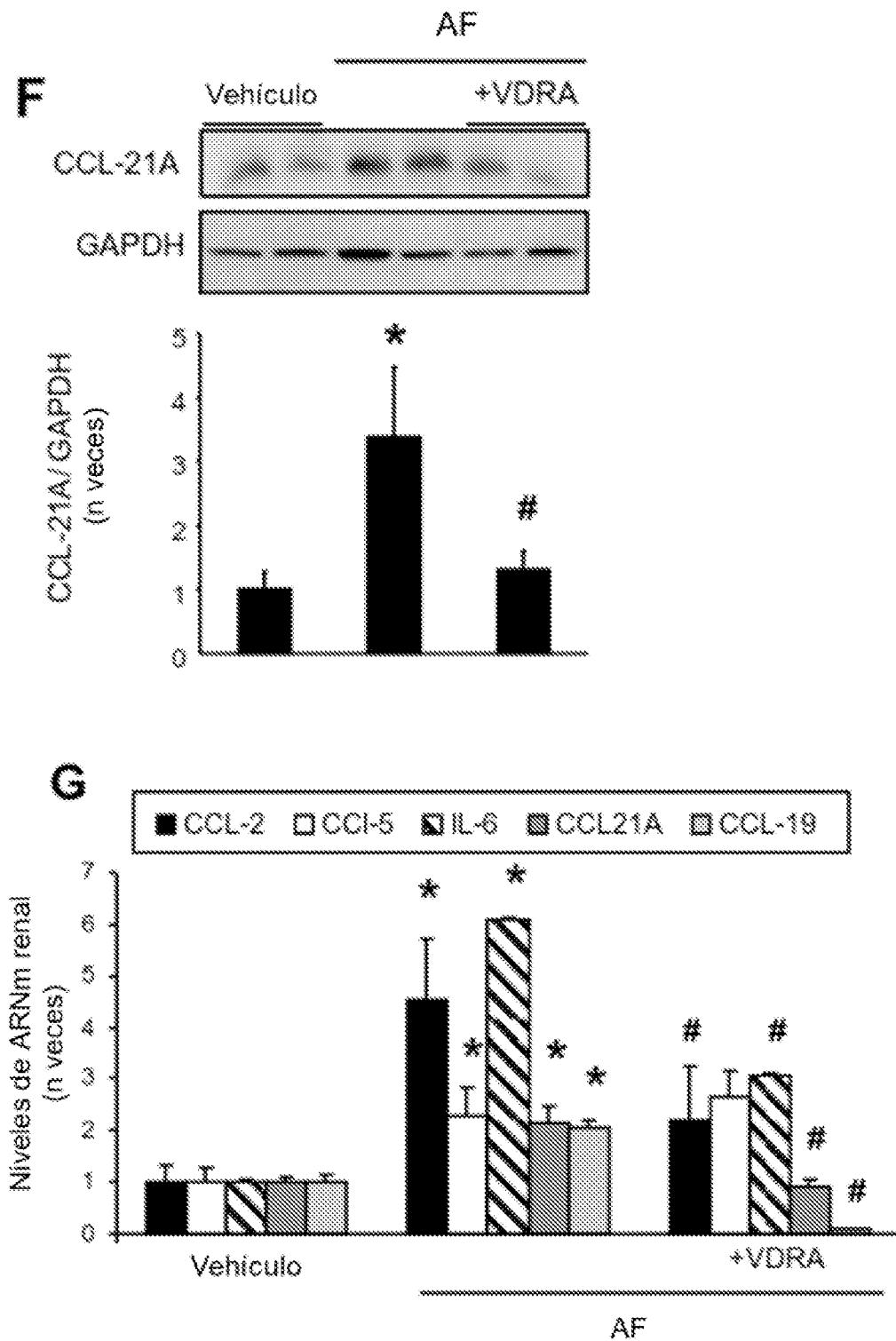


Figura 14 (cont.)

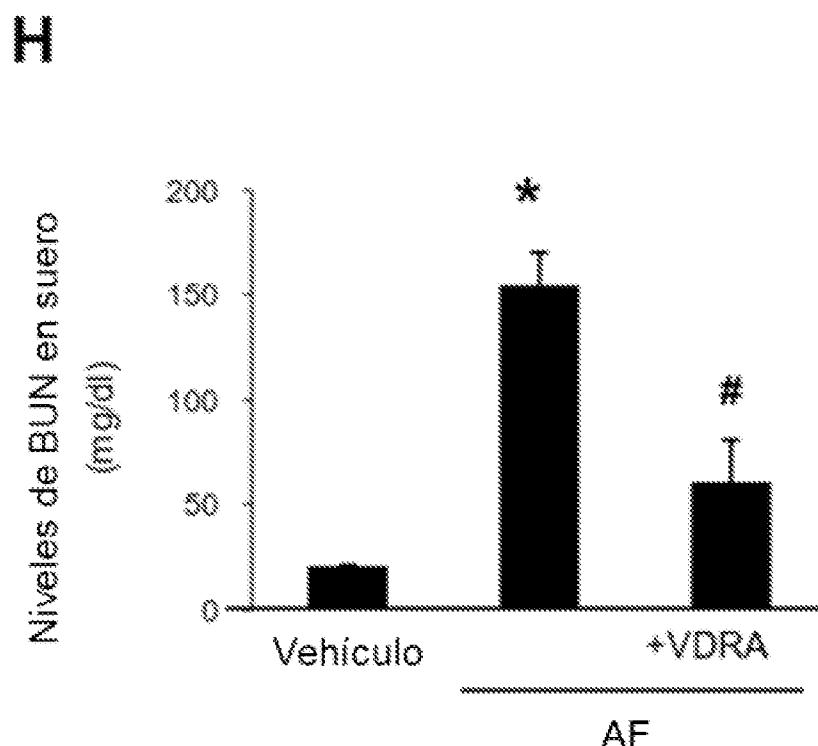


Figura 15

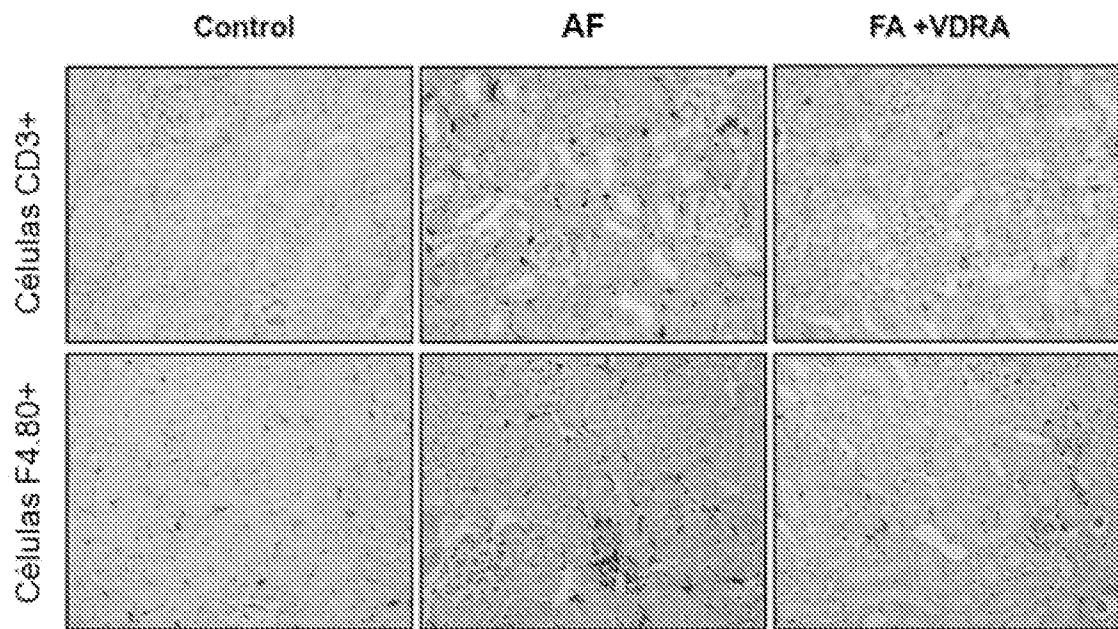


Figura 16

